

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR  
ANNABELLE ST-PIERRE

CARACTÉRISATION DES EXTRACTIBLES PROVENANT DES RÉSIDUS DE  
SCIAGE DU PEUPLIER FAUX-TREMBLE (*POPULUS TREMULOIDES*) ET  
ÉVALUATION DE LEUR ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE

DÉCEMBRE 2018

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier ma directrice de recherche, Professeure Isabel Desgagné-Penix, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire en tant qu'assistante de recherche d'abord, et qui m'a offert par la suite de poursuivre à la maîtrise au sein de son équipe. C'est avec enthousiasme que j'ai accepté ce défi qui m'a permis de vivre une expérience passionnante et enrichissante. Durant ces deux belles années, la rigueur scientifique, le positivisme et l'ouverture d'esprit d'Isabel m'ont permis d'accomplir des travaux de recherche qui surpassent mes attentes et j'en suis grandement reconnaissante. Je remercie également mon codirecteur, Dr. André Lajeunesse, pour son support et ces précieux conseils, surtout en ce qui concerne la chimie analytique. Je remercie les membres d'Innofibre et principalement Nathalie Bourdeau et Julien Bley pour les efforts investis dans ce projet et leur encadrement ainsi que leur soutien exemplaire tout au long de celui-ci. Je remercie également Stéphanie Blais et Josée Doucet pour la réalisation de nombreux protocoles nécessaires dans le projet. Tous ensemble, ils ont su être une source d'inspiration dans la réalisation de ma maîtrise et je n'aurais pas pu tomber sur une équipe plus passionnée et dévouée que celle-ci.

J'offre mes remerciements à tous mes collègues de laboratoire pour leur aide et leurs conseils et je remercie principalement Dorian Blondeau, ma grande amie et coéquipière dans ce projet, sans qui ma maîtrise n'aurait pas pris une envergure aussi importante. Les multitudes de protocoles de laboratoire que nous avons réalisés en binôme nous ont permis de partager nos connaissances et cumuler nos atouts afin de nous surpasser. Notre belle complicité s'est d'ailleurs étendue au-delà de nos tâches universitaires et je conserve d'agréables souvenirs de nos nombreux moments passés ensemble.

Je remercie les professeurs Hugo Germain, Simon Barnabé, Gervais Bérubé, Lionel Berthoux et Marc Beauregard, pour leur aide et pour nous avoir permis d'utiliser leur laboratoire et leurs appareils.

Je ne peux continuer mes remerciements sans dire un énorme merci à mes parents, Luc St-Pierre et Josée Bérubé ainsi que mon conjoint Dorian Ciszewski, sans qui je n'aurais pas pu me rendre aussi loin dans mon cheminement académique. Ils ont toujours su me pousser afin que je livre le meilleur de moi-même et ils m'ont soutenu tout au long de mes études ce qui m'a permis de rester positive et d'avoir une plus grande confiance en moi.

Je souhaite, remercier également Patrick Marchand et Dominic Desrosiers du Groupe Sani Marc ainsi que Pascal Dubé du Centre de Recherche industrielle du Québec (CRIQ), pour leur aide considérable dans la réalisation de protocoles nécessaires à notre projet. Je remercie finalement nos précieux collaborateurs et les organismes subventionnaires, incluant Forêt Modèle du Lac-St-Jean (FMLSJ), Groupe Sani Marc, le centre de valorisation de la biomasse (CVB), le consortium de recherche et d'innovation en bioprocédés industriels au Québec (CRIBIQ), le programme MITACS et le conseil en recherche en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) pour leur importante aide financière.

## AVANT-PROPOS

Ce mémoire fait l'objet du travail réalisé de septembre 2016 à août 2018 dans le cadre de la maîtrise en biologie cellulaire et moléculaire. Il a été effectué sous la supervision de la professeure Isabel Desgagné-Penix en collaboration avec le professeur André Lajeunesse dans le département de chimie, biochimie et physique. Ce mémoire présente l'article intitulé « Phytochemical screening of quaking aspen (*Populus tremuloides*) extracts by UPLC-QTOF-MS and evaluation of its antimicrobial activity » qui a fait l'objet d'une publication dans le journal « Molecules » le 16 juillet 2018.

Cette maîtrise correspond à un des volets du projet intitulé « Production de molécules biocides issues d'extractibles forestiers pour la fabrication de produits d'assainissement » qui est né d'une collaboration entre l'entreprise Sani Marc et l'organisme Forêt Modèle du Lac-St-Jean (FMLSJ). Sani Marc est une entreprise œuvrant dans la production de produits d'assainissement qui avait pour souhait d'élargir sa gamme de produits ménagers avec l'intégration de produits formulés avec des agents actifs plus « verts » et moins polluants. Or, les produits commercialisés actuellement sont formulés avec des composés d'ammoniums quaternaires et ceux-ci s'avèrent nocifs pour l'environnement et les écosystèmes. Quant à la FMLSJ, cet organisme s'occupe de la gestion des industries forestières dans la région du Lac-St-Jean et il avait pour mandat de revaloriser le marché forestier dans cette région. Plus particulièrement, la FMLSJ souhaitait donner une valeur ajoutée aux résidus d'écorce de deux feuillus, le peuplier faux-tremble et le bouleau blanc, des résidus sous-exploités à ce jour. Ainsi, l'objectif de ce projet était de valoriser les résidus d'écorce par l'extraction de molécules bioactives ayant des propriétés antimicrobiennes pour les intégrer à la formulation de produits d'assainissement. Puisque la composition chimique ainsi que les activités biologiques associées à celle-ci sont encore peu connues et étudiées, des chercheurs d'Innofibre et des professeurs de l'Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR) ont mis à profit leurs expertises afin de résoudre les problématiques soulevées par les deux entreprises

concernées. Également, un autre partenaire industriel a étroitement collaboré dans ce projet, soit la coopérative de valorisation de la biomasse (CVB).

Dans ce projet, Nathalie Bourdeau et Julien Bley (chercheurs pour Innofibre), ont développé le projet et ont offert le soutien nécessaire aux entreprises par l'entremise de leurs connaissances dans la valorisation de la biomasse et la transformation du bois. Aussi, les professeurs Isabel Desgagné-Pénix et André Lajeunesse ont offert leurs expertises respectives en biochimie, métabolomique et en chimie analytique pour superviser le projet de maîtrise présenté ici. Ainsi, ce projet, réalisé par ma collègue Dorian Blondeau et moi-même, avait comme objectif général de procéder à l'extraction et à la caractérisation des métabolites contenus dans les résidus d'écorce et d'évaluer le potentiel antimicrobien de ceux-ci. Les résultats présentés dans ce mémoire constituent des éléments déterminants pour l'orientation et l'avancement du projet général sur les biocides forestiers.

## RÉSUMÉ

Depuis les dernières décennies, l'émergence constante de souches pathogènes résistantes aux agents antimicrobiens est un défi d'envergure qui oblige à développer de nouveaux produits antimicrobiens de manière récurrente. La perte d'intérêt pour le développement d'agents biocides synthétiques en raison des coûts et de la pollution liés à sa production, complexifie ce défi et a mené les études vers la recherche de molécules antimicrobiennes d'origine naturelle. D'ailleurs, plusieurs études antérieures démontrent le potentiel des métabolites spécialisés chez plusieurs espèces végétales puisque celles-ci, au fil de millions d'années d'évolution, ont développé des mécanismes de défense contre une multitude d'agents nocifs externes tels que les champignons, les bactéries, les virus et les herbivores. Ainsi, dans cette étude, on s'intéresse à la nature et l'activité antimicrobienne des métabolites du peuplier faux-tremble (*Populus tremuloides*). Cet arbre, qui est très utilisé dans l'industrie forestière au Québec, génère une importante quantité de résidus qui assure un approvisionnement durable en biomasse pour le développement de produits biocides. Pour réaliser cet objectif, les métabolites du peuplier ont été extraits selon différentes conditions d'extraction. Le rendement en extractibles a révélé que les solvants polaires (méthanol, éthanol et eau) ainsi qu'un retrait des fractions < 3 mm de la matière première permettent un rendement supérieur à 15,0 % de grammes d'extractibles par gramme d'écorces sèches. L'activité antimicrobienne a ensuite été déterminée à l'aide de la méthode de microdilution en bouillon sur huit microorganismes pathogènes, dont cinq bactéries et trois champignons. Les résultats de concentration minimale inhibitrice et bactéricide/fongicide ont permis de déterminer que l'extrait à l'eau et celui au méthanol ont le meilleur potentiel antimicrobien. L'extrait à l'eau a permis d'inhiber les huit microorganismes et un effet bactéricide a été observé sur trois d'entre eux alors que l'extrait au méthanol a permis d'inhiber la prolifération de trois microorganismes et d'en éliminer un. Finalement, la caractérisation des extraits à l'eau et au méthanol a été effectuée par chromatographie liquide ultra performance couplée à un spectromètre de masse quadripôle à temps de vol. Cette analyse a permis d'identifier 92 composés dont majoritairement des polyphénols dans les deux extraits. 22 de ces molécules sont rapportées dans la littérature pour leur propriété antimicrobienne et neuf parmi celles-ci sont de la famille des flavonoïdes. Selon l'abondance relative de ces composés, le 4-hydroxybenzaldéhyde (5,44 %) et le kaempferol (5,03 %) semblent être dominant dans l'extrait au méthanol et à l'eau respectivement. Ainsi, le peuplier faux-tremble est une essence d'arbre intéressante pour le développement de produits biocides par l'entremise des métabolites spécialisés.

**Mots-clés :** Industrie forestière, antimicrobien, extractibles, métabolites spécialisés, peuplier faux-tremble, *Populus tremuloides*, biomasse, extraction.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>ii</b>
<b>AVANT-PROPOS .....</b>	<b>iv</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES ACRONYMES .....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTE DES SYMBOLES.....</b>	<b>xiv</b>
 <b>CHAPITRE I</b>	
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1 L'industrie forestière québécoise.....	1
1.1.1 Contexte actuel .....	1
1.1.2 Le bioraffinage.....	3
1.2 Les métabolites spécialisés d'origine végétale .....	8
1.2.1 Généralités .....	8
1.2.2 Les composés phénoliques.....	11
1.2.3 Les terpénoïdes .....	13
1.2.4 Les composés azotés (alcaloïdes) .....	14
1.2.5 Les composés glycosylés .....	15
1.3 Le peuplier faux-tremble ( <i>Populus tremuloides</i> ).....	16
1.3.1 Généralités .....	16
1.3.2 Le PFT dans l'industrie forestière québécoise.....	17
1.3.3 La composition chimique et les activités biologiques du PFT .....	18
1.4 Les antimicrobiens naturels .....	20
1.4.1 Définitions et généralités .....	20
1.4.2 Problématiques actuelles liées aux antimicrobiens.....	23
1.4.3 Les mécanismes d'action des antimicrobiens .....	24
1.5 Objectifs de recherche et hypothèses.....	27



<b>CHAPITRE II</b>	
<b>CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE DES EXTRAITS DE PEUPLIER FAUX-TREMBLE (<i>POPULUS TREMULOIDES</i>) PAR UPLC-QTOF-MS ET ÉVALUATION DE LEUR ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE.....</b>	<b>29</b>
2.1 Contribution des auteurs .....	29
2.2 Résumé de l'article .....	30
2.3 Article scientifique.....	31
Abstract.....	32
Introduction.....	33
Experimental.....	35
Plant material .....	35
Microbial strains .....	35
Determination of barks composition and extractives yield per fraction size .....	35
Extractives yield according to molecules polarity .....	36
Thin layer chromatography method (TLC) .....	37
Antimicrobial activity test by broth microdilution method .....	38
UPLC-QTOF-MS method .....	39
Statistical analysis.....	40
Results .....	40
Determination of barks composition and extractives yield per fraction size .....	40
Extractives yield according to molecules polarity .....	41
Thin Layer Chromatography (TLC) results.....	41
Antimicrobial results.....	42
UPLC-QTOF-MS characterization results .....	43
Discussion.....	45
Composition and extraction yield evaluation .....	45
Antimicrobial activity .....	46
Chemical characterization.....	47
Conclusion .....	49
Acknowledgments .....	50

References.....	51
Figures legends .....	61
Tables.....	65
Supplementary data .....	70
<b>CHAPITRE III</b>	
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>80</b>
3.1 Retour sur la problématique et les résultats .....	80
3.2 Limites et perspectives .....	86
3.3 Conclusion .....	91
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>93</b>

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
1.1	Les principales essences d'arbre commerciales au Québec.....	3
1.2	Proportion des différentes composantes chimiques du bois en fonction des différents types d'essence .....	6
1.3	Classification des principaux MS d'origine végétale .....	10

## LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Répartition des résidus de sciage provenant des industries forestières par domaine d'activité de valorisation en 2010.. .....	2
1.2	Schéma des voies possibles de valorisation de la biomasse forestière.. .....	4
1.3	Analyse du nombre de publications réalisées dans PubMed concernant la composition chimique des végétaux ainsi que leurs propriétés biologiques et pharmacologiques en fonction des années de publication. ....	7
1.4	Principales voies métaboliques menant à la biosynthèse des MS.....	11
1.5	Le peuplier faux-tremble ( <i>Populus tremuloides</i> ) et sa répartition géographique au Canada. ....	17
1.6	Exemples de métabolites naturels d'origine végétale reconnus pour leur potentiel antimicrobien. ....	22
1.7	Mécanismes d'action des composés antimicrobiens sur les microorganismes pathogènes et exemples d'antibiotiques associés à chacun d'eux. ....	26
1.8	Différences structurales entre la membrane cellulaire d'une bactérie à Gram positif (à gauche) et une bactérie à Gram négatif (à droite). ....	27

## LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES ACRONYMES

A.A.	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ASE	Extraction accélérée par solvant ( <i>Accelerated solvent extraction</i> )
ATP	Adénosine triphosphate
CCM	Chromatographie sur couche mince ( <i>thin layer chromatography</i> )
C <sub>n</sub>	Carbone, où n correspond à la position du groupement fonctionnel sur la ramification.
CAQ	Composé d'ammonium quaternaire
DMSO	Diméthylsulfoxyde
FeCl <sub>3</sub>	Chlorure de fer (III)
GC-MS	Chromatographie gazeuse ( <i>Gas chromatography</i> ) couplée à un spectromètre de masse ( <i>Mass spectrometry</i> )
INT	2-p-iodophenyl-3-p-nitrophenyl-5-phenyl tetrazolium chloride
IPP	Isopentenyl diphosphate
LPS	Lipopolysaccharide
MBC	Concentration minimale bactéricide ( <i>Minimum bactericidal concentration</i> )
MEP	Méthylérythritol phosphate
MFC	Concentration minimale fongicide ( <i>Minimum fungicidal concentration</i> )
MIC	Concentration minimale inhibitrice ( <i>Minimum inhibitory concentration</i> )
MP	Métabolite primaire
MS	Métabolite spécialisé
m/z	Ratio masse sur charge

NREL	<i>National Renewable Energy Laboratory</i>
OH	Groupelement hydroxyle (oxygène-hydrogène)
PFT	Peuplier faux-tremble
PHVA	Produit à haute valeur ajoutée
QTOF-MS	Spectromètre de masse ( <i>Mass spectrometry</i> ) de configuration quadripôle / temps de vol ( <i>Quadrupole time of flight analyzers</i> )
R <sub>f</sub>	Facteur de rétention ( <i>Retention factor</i> )
ROS	Dérivés réactifs à l'oxygène ( <i>reactive oxygen species</i> )
RT	Temps de rétention ( <i>retention time</i> )
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistante à la méthiciline
UPLC	Chromatographie liquide ultra-performance ( <i>Ultra-performance liquid chromatography</i> )
UQTR	Université du Québec à Trois-Rivières
UV	Ultraviolet
VIS	Visible

## LISTE DES SYMBOLES

CFU	Unité formatrice de colonie ( <i>Colony forming unit</i> )
cm	Centimètre
°C	Degré Celsius
g	Gramme
h	Heure
L	Litre
mg	Milligramme
min	Minute
ml	Millilitre
mm	Millimètre
nm	Nanomètre
$P$	Probabilité
psi	Livre-force par pouce carré ( <i>pound-force per inch</i> )
ppm	Partie par million
$R^2$	Coefficient de détermination
V	Volt
% m/m	Pourcentage massique
$\beta$	Bêta
$\mu\text{L}$	microlitre

## **CHAPITRE I**

### **INTRODUCTION**

#### **1.1 L'industrie forestière québécoise**

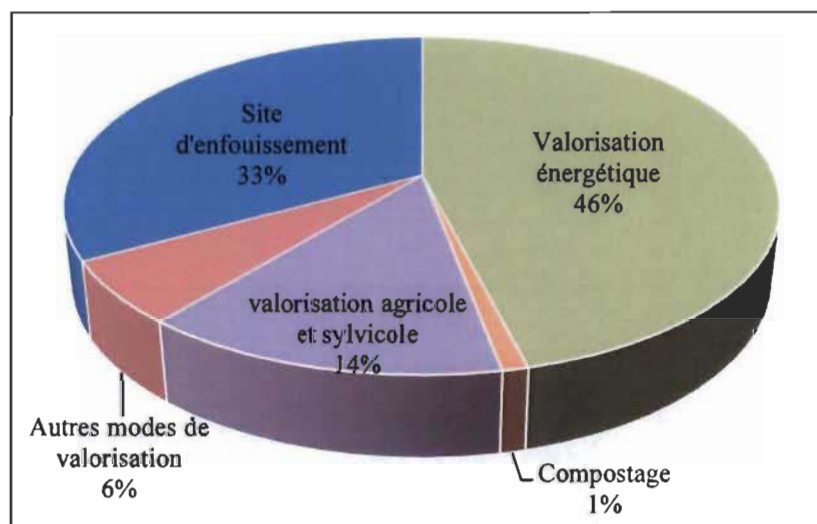
##### **1.1.1 Contexte actuel**

L'industrie forestière occupe une place considérable sur le plan économique au Québec. En occupant 761 100 km<sup>2</sup>, soit plus de 46 % du territoire québécois, la forêt garantit une biomasse très abondante, diversifiée et renouvelable [1]. L'exploitation de celle-ci offre un nombre important d'emplois dans différents secteurs d'activité, soit entre autre l'industrie papetière, la production de bois d'œuvre et plusieurs autres. Ces activités représentent environ 4 % du produit intérieur brut (PIB) au Québec [2, 3]. Cependant, le marché forestier connaît une baisse d'activité importante depuis les dernières années, principalement dans le secteur des pâtes et papiers. Cette baisse est due à l'accroissement de l'utilisation des technologies numériques. La concurrence entre les différentes entreprises est également un problème qui amène la fermeture de postes. Pour tenter de redresser cette économie, les industries tentent de se diriger et innover vers de nouvelles sphères d'activité [4, 5].

Actuellement, les industriels, avec l'appui du gouvernement, ont développé un plan stratégique intitulé « La forêt pour construire le Québec de demain ». Cette réforme a, entre autres, pour but de se tourner vers le développement de bioproduits qui inclut notamment le bioraffinage, soit la transformation des composés chimiques issus du bois par une série de procédés industriels pour en faire des produits à haute valeur ajoutée (PHVA). Puisqu'une grande proportion des composés se trouve dans les écorces, il est suggéré que cette activité se fasse en parallèle à l'exploitation actuelle. En effet, lors de la transformation du bois, l'industrie forestière génère une quantité importante de résidus de



sciage dont en grande partie des écorces [6]. Une étude du ministère des ressources naturelles et de la faune (MRNF) en 2008 a révélé que les industries forestières génèrent plus de 6 millions de tonnes de résidus anhydres annuellement [1, 7]. Cette importante biomasse pourrait donc assurer un approvisionnement suffisant pour les activités de bioraffinage. Pour le moment, la principale voie de valorisation de ces résidus est la combustion afin d'alimenter en énergie des usines de cogénération. Aussi, une importante proportion des résidus de sciage est enfouie dans les sols et demeure inexploitée (voir Figure 1.1). [2, 6, 8]. Ainsi, cette sous-exploitation des ressources motive les industries forestières du Québec au développement de plateformes de bioraffinage.



**Figure 1.1** Répartition des résidus de sciage provenant des industries forestières par domaine d'activité de valorisation en 2010, d'après [9].

En plus d'occuper une superficie importante, la forêt québécoise est énormément diversifiée. Elle renferme environ 850 espèces végétales dont plus d'une centaine d'essences d'arbre [7]. Elle est divisée en trois zones de végétation (boréale, mixte et feuillue) qui se distinguent par différents bioclimats. Ces zones regroupent ainsi une variété de conifères et de feuillus ayant des propriétés biologiques spécifiques. De plus, selon leurs caractéristiques physiologiques, certaines essences se développent plus facilement et peuvent être plus abondantes que d'autres. Le Tableau 1.1 représente la liste des principales essences d'arbres au Québec. Selon les

données statistiques de l'industrie forestière publiées par le ministère des ressources naturelles et de la faune (MRNF) en 2016, le sapin baumier, les épinettes, le pin gris et les mélèzes sont les plus abondants parmi les résineux alors que ce sont les peupliers du côté des feuillus [10]. Chaque essence possède une composition chimique qui lui est propre. Grâce à cette importante diversité, le Québec représente un énorme bassin de molécules pouvant être des précurseurs pertinents au développement d'agents thérapeutiques, cosmétiques et alimentaires.

**Tableau 1.1**

Les principales essences d'arbre commerciales au Québec<sup>1</sup>

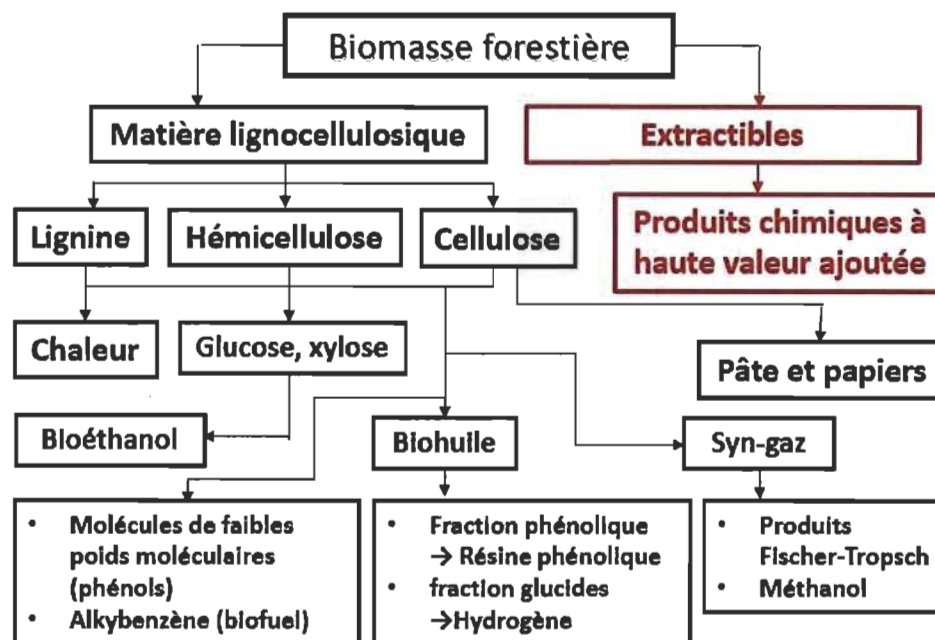
Résineux	Feuillus
Épinette blanche ( <i>Picea glauca</i> )	Érable à sucre ( <i>Acer saccharum</i> )
Épinette de Norvège ( <i>Picea abies</i> )	Érable rouge ( <i>Acer rubrum</i> )
Épinette noire ( <i>Picea mariana</i> )	Bouleau blanc ( <i>Betula papyrifera</i> )
Épinette rouge ( <i>Picea rubens</i> )	Bouleau jaune ( <i>Betula alleghaniensis</i> )
Pin blanc ( <i>Pinus strobus</i> )	Chêne à gros fruits ( <i>Quercus macrocarpa</i> )
Pin rouge ( <i>Pinus resinosa</i> )	Chêne rouge ( <i>Quercus rubra</i> )
Pin gris ( <i>Pinus banksiana</i> )	Frêne d'Amérique ( <i>Fraxinus americana</i> )
Mélèze laricin ( <i>Larix laricina</i> )	Frêne de Pennsylvanie ( <i>Fraxinus pennsylvanica</i> )
Mélèze d'Europe ( <i>Larix decidua</i> )	Orme d'Amérique ( <i>Ulmus americana</i> )
Mélèze du Japon ( <i>Larix kaempferi</i> )	Caryer corniforme ( <i>Carya cordiformis</i> )
Sapin Baumier ( <i>Abies balsamea</i> )	Tilleul d'Amérique ( <i>Tilia glabra</i> )
Pruche du Canada ( <i>Tsuga canadensis</i> )	Noyer noir ( <i>Juglans nigra</i> )
Thuya occidental ( <i>Thuja occidentalis</i> )	Peuplier hybride
	Peuplier faux-tremble ( <i>Populus tremuloides</i> )
	Peuplier baumier ( <i>Populus balsamifera</i> )
	Peuplier deltoïde ( <i>Populus deltoides</i> )

<sup>1</sup>Tirés de [11].

### 1.1.2 Le bioraffinage

Comme mentionné, le bioraffinage est l'une des filières envisagées pour revaloriser les résidus de sciage et relancer l'industrie forestière. Dans une bioraffinerie, les

composantes structurales du bois, soit les composés lignocellulosiques (la cellulose, l'hémicellulose et la lignine) sont transformées pour produire des biocarburants, des produits chimiques spéciaux, des précurseurs de matière plastique et autres polymères [4, 5]. Les autres composantes du bois d'intérêt pour le bioraffinage sont les « extractibles », soit en grande majorité des métabolites spécialisés (MS) produits naturellement par les végétaux. Ces molécules sont faciles à extraire à l'aide d'un solvant. À l'inverse des macromolécules mentionnées précédemment, les extractibles sont de faibles poids moléculaires et leur extraction ne nécessite pas de traitement chimique, physique ou thermique sévère pour les retirer de la structure du bois en raison de leurs liaisons de faible énergie avec les composés lignocellulosiques [2, 12]. Actuellement, les extractibles sont très recherchés et étudiés car ceux-ci possèdent, pour la plupart, des propriétés biologiques pertinentes pour le développement de PHVA recherchés dans les marchés pharmaceutiques, cosméceutiques, sanitaires, alimentaires et nutraceutiques. Ainsi, les voies de conversion de la biomasse forestière sont multiples : bioénergie, production de combustibles, formation de biomatériaux, synthèse de bioproduits, etc. (voir Figure 1.2) [5, 11].



**Figure 1.2** Schéma des voies possibles de valorisation de la biomasse forestière. D'après [11].

D'abord, parmi les composés lignocellulosiques, il y a la cellulose, l'hémicellulose et la lignine qui se retrouvent en différentes proportions selon la nature de l'essence forestière (voir Tableau 1.2) [5]. La cellulose et l'hémicellulose sont des polysaccharides qui étaient initialement les composantes de base pour la production de pâtes et papiers mais il s'avère que celles-ci peuvent avoir plusieurs autres applications. Par exemple, la cellulose peut être convertie en monomère de glucose et l'hémicellulose en monomère de différents sucres tels que le mannose, le xylose, l'arabinose, le galactose et le glucose par hydrolyse enzymatique. Ils peuvent être transformés par la suite en éthanol par fermentation levurienne [13, 14]. Aussi, la pâte produite par la cellulose peut être convertie en fibres et en pellicules de cellulose, un polyester utilisé pour la fabrication de différents emballages. Certains dérivés de la cellulose peuvent également servir d'explosifs (nitrocellulose), d'additifs texturants dans différents produits commerciaux ou encore d'agents de renforcement dans les polymères biodégradables et les nanocomposites (nanocellulose cristalline) [5, 15, 16]. L'hémicellulose est quant à elle une source de furfural, d'acide levulinique et de xylose, des précurseurs d'intérêt pour de nombreux

bioproduits. À titre d'exemple, le furfural est utilisé dans des produits pour le traitement du bois et pour fabriquer des résines [5, 17].

En ce qui concerne la lignine, ce composé lignocellulosique est un grand polymère de composés phénoliques ayant un poids moléculaire élevé. La lignine est une source importante de diverses molécules telles que les polyols, lignosulfonates, polyuréthanes, etc. La lignine isolée peut être utilisée pour la fabrication de fibres de carbone, de dérivés de plastique ou encore de mousses et membranes polymériques. Aussi, plusieurs des produits issus de la lignine pourraient avoir un potentiel dans l'industrie pétrochimique [5, 18].

Ces trois macromolécules représentent une importante source de combustibles puisqu'elles sont formées d'hydrocarbures tout comme le pétrole et le gaz naturel. Ainsi, une large proportion de ces composés lignocellulosiques augmente le pouvoir calorifique de la biomasse forestière et permet de générer plus d'énergie sous forme de chaleur [19-21].

**Tableau 1.2**

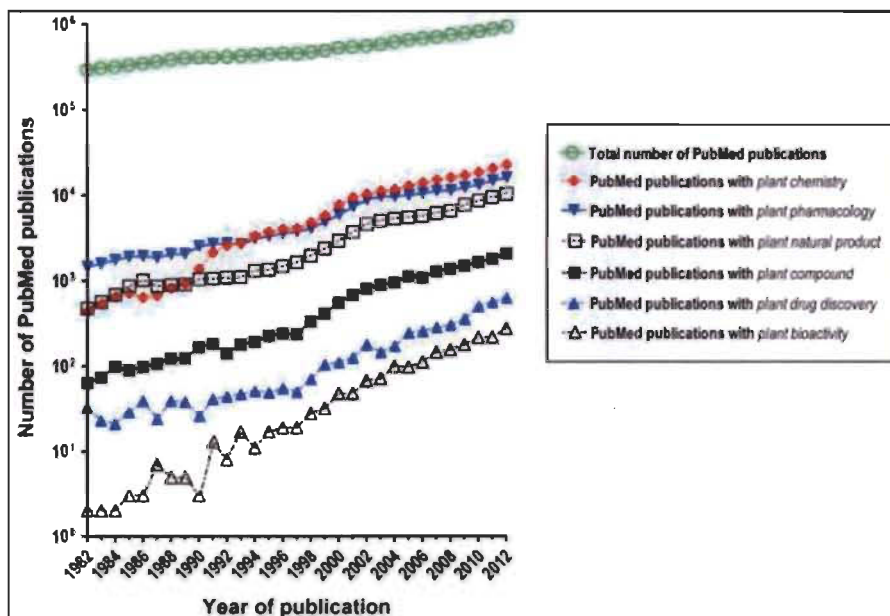
Proportion des différentes composantes chimiques du bois en fonction des différents types d'essence<sup>1</sup>

<b>Type d'essence</b>	<b>Composante du bois (%)</b>			
	<b>cellulose</b>	<b>hémicellulose</b>	<b>lignine</b>	<b>matières extractibles</b>
<b>Bois de résineux</b>	41-46	25-32	26-31	2-5
<b>Bois de feuillus</b>	42-49	23-24	20-26	3-8
<b>Écorces</b>	16-40	38-58	40-50	2-25

<sup>1</sup>Tirés de [5].

En ce qui concerne les extractibles, leur intérêt dans le bioraffinage vient principalement de l'engouement de la population pour les tendances « vertes » et les produits naturels. En effet, depuis les dernières décennies, il y a un intérêt grandissant des

scientifiques envers les bioproduits naturels dérivés des métabolites des végétaux. Ce constat est d'ailleurs démontré par une importante augmentation des publications concernant la composition chimique des végétaux ainsi que leurs propriétés biologiques et pharmacologiques selon les données rapportées par the Medline Summary Tool (MEDSUM) entre les années 1982 et 2012 (voir Figure 1.3) [22]. Ainsi, puisque de nombreuses études ont démontré que ces molécules ont plusieurs propriétés biologiques intéressantes (antimicrobienne, antioxydante, antivirale, anti-inflammatoire, cytotoxique, anticancer, etc.,) la demande en molécules naturelles a augmenté de manière importante depuis les dernières années. Ces composés sont très intéressants pour la fabrication de médicaments, de pesticides en agriculture, d'additifs alimentaires ou autres produits de santé naturels. Aussi, l'intérêt de développer des produits bioactifs naturels est également directement associé aux avancées technologiques et scientifiques qui permettent de cribler facilement les MS chez les végétaux et d'évaluer leurs propriétés biologiques [2, 23]. Ces métabolites seront traités plus en détail dans la section suivante.



**Figure 1.3** Analyse du nombre de publications réalisées dans PubMed concernant la composition chimique des végétaux ainsi que leurs propriétés biologiques et pharmacologiques en fonction des années de publication [22]<sup>1</sup>.

Il est à noter que le bois contient aussi une faible proportion en matières inorganiques, soit des minéraux tels que le potassium, le calcium et le sodium. Ces composés inorganiques n'ont pas de réelle application dans l'industrie forestière et ils sont plutôt considérés comme des composés indésirables lors du bioraffinage. En effet, ils ne contiennent pas d'extractibles, n'ont pas de potentiel énergétique et ont même pour effet d'abaisser la capacité calorifique de la biomasse [24]. De plus, ils sont également une composante indésirable dans le processus d'extraction des MS ou encore lors de la combustion pour produire de l'énergie car ils peuvent endommager la machinerie utilisée à ces fins [25, 26]. Afin d'exploiter la matière première à son maximum, les processus de bioraffinage débutent préférentiellement par un prétraitement afin de retirer la matière inorganique qui se trouve généralement dans les plus petits fragments de la biomasse [27, 28].

<sup>1</sup> Les données ont été recueillies par MEDSUM (<http://webtools.mf.uni-lj.si/public/medsum.html>) entre les années 1982 et 2012. Les mots-clés utilisés pour l'acquisition de ces données étaient les suivants : *plant chemistry*, *plant pharmacology*, *plant natural product*, *plant compound*, *plant drug discovery* and *plant bioactivity*.

## 1.2 Les métabolites spécialisés d'origine végétale

### 1.2.1 Généralités

Les espèces du règne végétal produisent une multitude de molécules appelées « métabolites » dont plus de 200 000 ont été isolées et identifiées à ce jour [29, 30]. Ces métabolites se divisent en deux groupes : les métabolites primaires (MP) et spécialisés (MS). Les MP sont des molécules dites essentielles car elles sont nécessaires à la survie de la plante en exerçant un rôle sur la croissance et le développement de celle-ci. Les MP comprennent les acides gras, les sucres, les acides aminés (A.A). et les acides nucléiques, soit les composantes de base des protéines, des lipides, de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et de l'acide ribonucléique (ARN). Ainsi, les mêmes MP sont produits par chaque espèce, ce qui n'est pas le cas pour les MS. Les MS eux sont beaucoup plus diversifiés et ils ne sont pas produits en aussi grande quantité que les MP. Ils ne sont généralement pas produits par tous les végétaux car ils proviennent de voies métaboliques plus complexes et spécialisées [23, 29, 30]. D'ailleurs, certains sont très spécifiques à quelques espèces seulement et leur présence peut être des indicateurs du groupe taxonomique qui informe sur la famille, le genre ou l'espèce de la plante qui les produisent [30, 31]. Puisqu'il en existe plus de 100 000, les MS sont séparés en différentes classes basées principalement sur la voie métabolique servant à les synthétiser et également sur leur structure (voir Figure 1.4). Il est encore difficile de statuer sur la classification des MS car plusieurs d'entre eux possèdent une structure qui appartient à plus d'un groupe. Cependant, il a été établi qu'il y a trois classes majoritaires qui sont les phénoliques, les terpénoïdes et les composés azotés qui sont ensuite subdivisés en plusieurs sous-groupes (voir Tableau 1.3) [23, 30].

D'un point de vue évolutif, les MS ne sont pas directement liés à la survie de la plante, mais ils jouent un rôle dans le « fitness » de celle-ci. Bien qu'ils aient longtemps été perçus comme des « déchets » inutiles chez la plante, plusieurs études sur ces composés ont démontré le contraire. En effet, ces molécules sont si sophistiquées que leur biosynthèse, leur transport et leur entreposage nécessitent plusieurs gènes codant pour des



protéines spécifiques issues de la sélection naturelle au fil de millions d'années. Ces gènes sont quant à eux activés et transcrits par différents facteurs de transcription. L'ensemble de ces mécanismes requiert une dépense énergétique en ATP considérable qu'il est évident que l'organisme tire un avantage évolutif en produisant ces MS [30, 31]. En s'attardant à ces molécules, il a été démontré que celles-ci agissent comme signaux à l'intérieur de la plante ou envers les organismes à proximité tels que les autres plantes, les microbes, les herbivores, les prédateurs de ces herbivores, les pollinisateurs et les animaux effectuant la zoochorie (transport des semences de la plante par les animaux). Les MS agissent également dans les processus de défense pour protéger la plante en cas de stress biotique causé par différents envahisseurs tels que les herbivores, les microbes, les virus ou encore d'autres espèces végétales qui entrent en compétition avec l'organisme pour les nutriments, l'eau et la lumière. Finalement, ils agissent également en cas de stress abiotique pour protéger la plante contre les ultraviolets (UV), les oxydants, la sécheresse, la température, etc. [29, 30]. Ces molécules pourraient, entre autre, avoir ces fonctions grâce à leur structure s'apparentant aux substrats endogènes (hormones ou neurotransmetteurs) ou encore en mimant la réponse d'un ligand au niveau du récepteur cible. Grâce à leur structure complexe possédant parfois plusieurs groupements fonctionnels, les métabolites ont souvent plus d'une cible ce qui permet à l'organisme de mieux se défendre contre plusieurs agents à la fois [30, 32].

**Tableau 1.3**

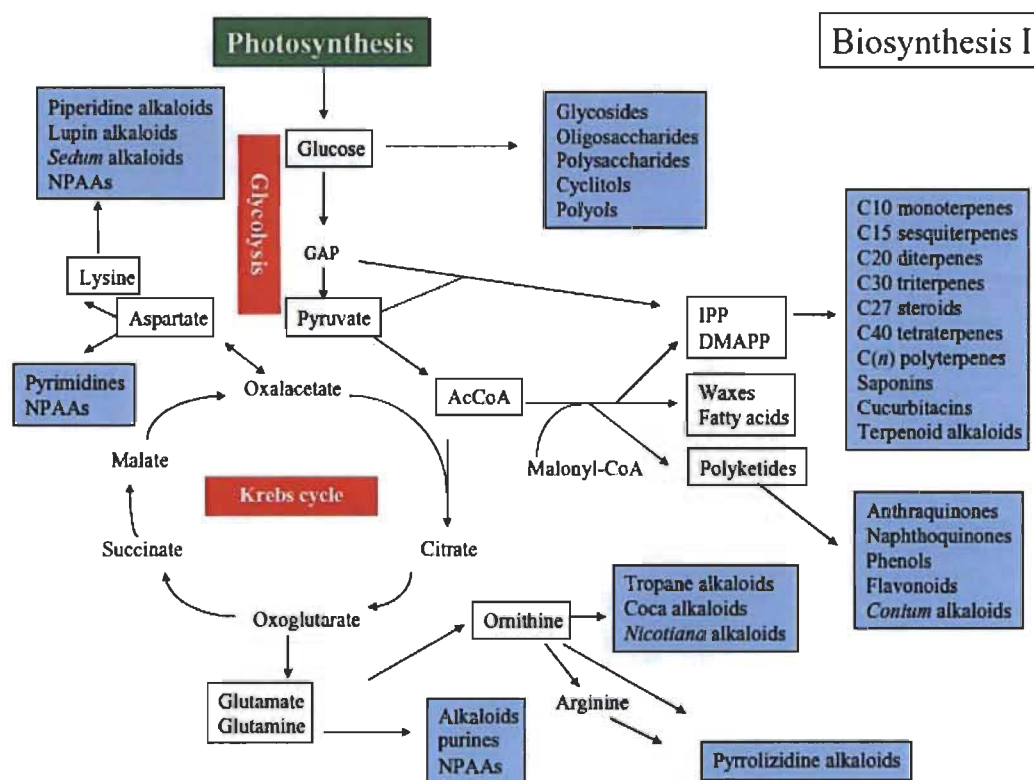
Classification des principaux MS d'origine végétale

<b>Composés phénoliques<sup>1</sup></b>	<b>Terpénoïdes<sup>2</sup></b>	<b>Composés azotés<sup>3</sup></b>
flavonoïdes	monoterpènes	alcaloïdes
tannins (hydrolysables et condensés)	sesquiterpènes	A.A. non protéiques
lignines	diterpènes	glycosides cyanogéniques
coumarines	triterpènes	glucosinolates
acides phénoliques	tétraterpènes	alcamides
phénols simples	sesterpènes	lectines, peptides, polypeptides
	polyterpènes	

<sup>1</sup>Tirés de [29, 30]<sup>2</sup>Tirés de [30, 33]<sup>3</sup>Tirés de [30]

Ainsi, depuis les dernières années, une meilleure connaissance des différents rôles des MS et l'arrivée des techniques analytiques modernes ont amené plusieurs chercheurs à s'intéresser à ces molécules et aux propriétés biologiques qui leur sont associées [23, 30]. Il reste cependant plusieurs difficultés à relever quant à l'approvisionnement de ces métabolites. D'abord, la nature et la concentration des métabolites synthétisés chez une espèce varie considérablement en fonction de la saison, du lieu, de l'âge, des conditions du sol, des conditions climatiques, des pathogènes et des prédateurs, etc. [2, 34]. Ainsi, l'absence d'un métabolite peut s'expliquer par les différents mécanismes d'expression des gènes associés à sa synthèse ou sa dégradation. Certains de ces gènes sont régulés par expression induite, c'est-à-dire qu'ils sont exprimés uniquement lors d'une condition de stress (prédateur, pathogènes, facteur environnemental, etc.) qui déclenche la synthèse (ou la dégradation) du métabolite bioactif. Aussi, certains requièrent un mécanisme d'activation biochimique pour être exprimés et mener à la synthèse du métabolite d'intérêt, soit par exemple à un stade de développement précis ou dans un tissu spécifique sans être régulés par un facteur externe. Ces mécanismes d'expression permettent de réduire le coût énergétique lié à la synthèse des MS [31, 35]. Ainsi, ces métabolites sont

généralement très peu abondants ce qui peut rendre leur extraction difficile. À titre d'exemple, le taxol®, un terpénoïde provenant des écorces de bois d'ifs et qui est utilisé commercialement pour ses propriétés anticancéreuses, est présent à moins de 0,5 g par arbre (soit en moyenne 0,06 % par poids d'écorces sèches) [36, 37]. Finalement, prédire l'effet que peut avoir un métabolite sur un organisme demeure un important défi en raison des potentiels effets antagonistes ou synergiques qui peuvent exister entre les différents composés présents dans un extrait [32, 38].



**Figure 1.4** Principales voies métaboliques menant à la biosynthèse des MS [30].

### 1.2.2 Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des composés nombreux et très importants chez les végétaux alors qu'ils sont peu communs chez les bactéries, les champignons et les algues. Plus de 8 000 molécules appartenant à la classe des composés phénoliques ont été identifiées à ce jour et celles-ci ont des structures énormément diversifiées qui sont

souvent uniques à chaque espèce [29, 34]. Au départ, le terme « phénolique » était utilisé pour définir tous les composés naturels cycliques où sont rattaché un ou plusieurs substituants hydroxyles (OH) et qui peuvent posséder également d'autres groupements fonctionnels. Cependant, cette définition n'était pas satisfaisante puisqu'elle incluait plusieurs molécules qui appartiennent également à une autre classe de composés. Par exemple le gossypol ou l'hormone oestrone appartiennent principalement à la classe des terpénoïdes mais leur structure répond aussi à la définition des composés phénoliques. Ainsi, pour être plus spécifique, Quideau *et al.* ont déterminé que les composés phénoliques sont l'ensemble des molécules provenant des voies de biosynthèse des shikamates/phénylpropanoïdes ou acétate/malonate [39]. Ces composés sont divisés en plusieurs sous-groupes en fonction de leur structure de base (voir tableau 1.3). Par exemple, les C<sub>6</sub> sont des phénols simples ou des benzoquinones, les C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> sont des acides phénoliques, les C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sont des flavonoïdes, les (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)<sub>n</sub> sont des tannins condensés, etc. [29, 40]. Parmi ces sous-groupes, ce sont les tannins condensés (ou proanthocyanidines) qui sont les plus abondants chez les arbres alors que ceux-ci sont généralement absents chez les herbacées.

D'abord, les polymères à base de phénols, tels que les lignines, les subérines ou les tannins condensés, ont principalement un rôle à jouer dans la stabilité et la robustesse de la plante pour la protéger contre les facteurs environnementaux pouvant lui causer des dommages (sécheresse, froid, etc.) [29, 41]. De plus, la plante est capable de synthétiser une multitude de phénols différents en réponse à des stress biotiques et abiotiques qui peuvent être causés par le climat, les pathogènes et autres prédateurs, la non-disponibilité des ressources, etc. Puisque ces facteurs ont généralement pour effet d'augmenter la production de radicaux libres et autres dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), la synthèse de composés phénoliques permet de protéger les cellules de la plante contre ces agents nocifs car ceux-ci sont capables de les réduire facilement grâce à leur groupement OH [29, 42]. Ce mécanisme d'action rend les composés phénoliques particulièrement intéressants dans la recherche d'agents antioxydants pour les marchés pharmaceutiques, alimentaires, nutraceutiques ou encore cosméceutiques. Les anthocyanidines sont de bons exemples de flavonoïdes déjà bien connus et recherchés pour leur activité antioxydante [42, 43].

Outre leur propriété antioxydante, les composés phénoliques ont également d'autres applications pharmacologiques. En effet, ceux-ci agissent comme agents protecteurs en tant que toxines naturelles contre les animaux et autres organismes envahisseurs tel que les herbivores, les nématodes, les insectes, les champignons et les bactéries. Certains gènes associés à la synthèse de ces molécules sont constitutifs, ce qui permet à ces métabolites d'agir comme barrière chimique contre les ennemis dans l'ensemble des cellules de la plante. D'autres sont plutôt exprimés au site de l'attaque suite à une réponse hypersensible et finalement certains peuvent également être induits en réponse à la production de phytohormones associées à des mécanismes de défense, soit les salicylates et les jasmonates. Puisqu'ils sont exprimés à distance par rapport au site primaire de l'infection, les composés phénoliques synthétisés devront être transportés dans la plante pour pouvoir ensuite protéger cette dernière contre la propagation de l'infection et les futures attaques [44-46]. De bons exemples de composés phénoliques ayant ces fonctions sont l'arbutine et le resveratrol [43, 47].

### 1.2.3 Les terpénoïdes

Les terpénoïdes (ou isoprénoïdes) représentent le groupe de MS qui possède le plus de composés, soit plus de 40 000 identifiés à ce jour. Dans les plantes, l'ensemble de ces molécules sont de longues chaînes de carbone formées à partir de la fusion d'unités C5, des isopentenyl diphosphate aussi nommés isopentenyl pyrophosphate (IPP). Les IPP peuvent être synthétisés par deux voies métaboliques : la voie du mévalonate (voie MVA) et la voie du méthylérythritol phosphate appelée voie MEP. Les terpénoïdes sont subdivisés en plusieurs sous-classes qui renseignent sur le nombre d'unités C5 qui composent la structure (voir table 1.3). Par exemple, les structures formées de deux unités C5 sont des monoterpènes, celles de trois unités sont des sesquiterpènes et ainsi de suite [33, 48].

L'énorme variabilité entre les structures des terpénoïdes amène ceux-ci à avoir des fonctions et des applications très variées. Bien que les terpénoïdes soient considérés

comme étant des MS, des études sur ces molécules ont révélé que certaines d'entre elles ont un rôle à jouer dans la croissance, le développement et la reproduction des plantes. Par définition, certains terpénoïdes feraient également partie des MP, comme c'est le cas par exemple des pigments photosynthétiques, tels que les caroténoïdes et les chlorophylles, des composés nécessaires à la survie de la plante [33, 49]. D'autres terpénoïdes ont également un rôle à jouer dans la défense de la plante contre les pathogènes et les prédateurs. L'un des mécanismes d'action connus chez les terpénoïdes est leur insertion et leur déplacement à l'intérieur de la membrane grâce à leur longue chaîne de carbone lipophile. De cette manière, ils sont capables de causer des fuites d'ions pouvant provoquer la mort cellulaire [43, 47]. Les terpènes à courte chaîne et à plus faible poids moléculaire sont volatils ce qui leur permet d'avoir un effet à distance. En effet, ces molécules ont pour rôle d'attirer les ennemis des herbivores, soit un autre mécanisme de défense indirect de la plante [48, 50]. Certains terpénoïdes ont aussi d'autres applications pharmaceutiques comme c'est le cas pour le camphre, un anti-inflammatoire, et l'artémisine un anti-paludique [33, 43, 51]. Certaines de ces molécules, comme le taxol®, ont même un rôle à jouer dans le traitement et la prévention du cancer [33, 43, 52]. Les terpénoïdes volatils sont aussi des fragrances et des saveurs ce qui les rend pertinents comme additifs dans différents produits tels que la nourriture, les savons, le tabac, les parfums, etc. Finalement, ils ont des propriétés intéressantes dans l'industrie chimique où on peut les utiliser comme adhésifs, émulsifiants, etc. [33, 43, 48].

#### **1.2.4 Les composés azotés (alcaloïdes)**

La classe des composés azotés comprend une multitude de molécules mais celles-ci sont en grande majorité des alcaloïdes. En effet, il y a un si grand nombre d'alcaloïdes identifiés actuellement que certains ouvrages les considèrent comme l'une des classes principales au même titre que les composés phénoliques et les terpénoïdes [23, 34]. Ainsi, les travaux présentés vont se concentrer sur ce groupe de molécules uniquement. Par définition, les alcaloïdes sont des molécules formées d'un hétérocycle qui comprend au moins un atome d'azote. Aussi, un alcaloïde peut être une molécule formée d'un hétérocycle mais dont l'atome d'azote n'est pas partie intégrante de ce dernier mais est

plutôt sur une ramification adjacente. Dans ce cas, ces alcaloïdes sont appelés des « pseudoalcaloïdes » ou « protoalcaloïdes ». Les alcaloïdes sont des dérivés d'A.A. tels que l'ornithine, l'arginine, la lysine, la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane [43, 53]. Ces métabolites sont bien connus d'abord puisqu'il en existe plus de 12 000 différents mais également parce qu'ils ont initialement occupé une place importante dans la médecine traditionnelle et sont encore aujourd'hui très étudiés pour leurs propriétés pharmacologiques [23, 34, 43].

Les alcaloïdes sont produits par différents organismes incluant les bactéries, les champignons, les animaux mais surtout par les plantes. Pour les végétaux, les alcaloïdes agissent comme des toxines pour se défendre contre les prédateurs (ex.: herbivores) et les microbes (bactéries et champignons) [23, 43]. Les cibles moléculaires de ces composés sont généralement des neurorécepteurs. Ils interfèrent ainsi dans la signalisation neuronale [43, 54]. Certains alcaloïdes sont aussi des agents mutagènes qui peuvent effectuer une intercalation ou une alkylation dans l'ADN. Plusieurs d'entre eux sont capables d'interférer avec l'ADN, les télomères, les télomérases, les topoisomérases, le cytosquelette ou la biosynthèse des protéines qui induisent l'apoptose [55-57]. Finalement, une certaine partie des alcaloïdes lipophiles sont les substrats des transporteurs ABC (ATP binding cassette transporters), des protéines souvent surexprimées dans les cellules cancéreuses, les parasites et les microbes [58, 59]. Pour ces raisons, plusieurs alcaloïdes sont déjà reconnus pour être de bons agents thérapeutiques. Par exemple, la camptothécine possède des propriétés anticancéreuses, la berberine possède une activité antimicrobienne alors que les  $\beta$ -carbolines sont de bons agents antiparasitaires [43, 53, 60, 61].

### 1.2.5 Les composés glycosylés

Il n'est pas rare de retrouver dans les plantes un bon nombre de MS reliés chacun à un ou plusieurs sucres de manière covalente. En effet, il existe plusieurs processus de conjugaison des MS chez les végétaux. Le plus répandu est la glycosylation qui est l'ajout d'un sucre sur un substrat, comme un MS ou une protéine, par une glycosyltransférase.

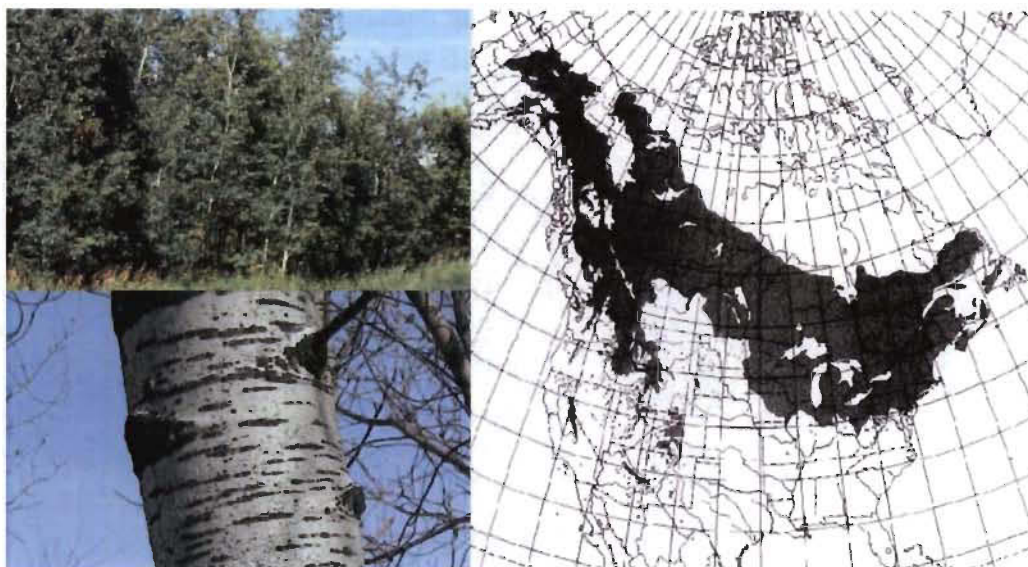
Ce sucre peut être transféré sur un groupement hydroxyle, sulfhydryle, amine ou carboxyle de l'accepteur [62]. Ces conjugaisons ont pour effet de changer les propriétés chimiques de base du substrat afin de lui fournir une nouvelle bioactivité, une nouvelle mobilité subcellulaire, une meilleure stabilité, ainsi qu'une modification de sa compartimentation. Ces modifications ont un rôle indirect dans les mécanismes de défense et de réponse à un stress [62-64]. Les mécanismes de glycosylation sont très diversifiés et plusieurs glycoformes d'un même substrat peuvent coexister. Par exemple, le flavonol quercétine existe sous environ 300 formes différentes de glycoside [65].

### **1.3 Le peuplier faux-tremble (*Populus tremuloides*)**

#### **1.3.1 Généralités**

Les peupliers sont des feuillus très abondants au Canada et plus particulièrement dans les forêts boréales. Parmi les 13 espèces de peuplier identifiées sur le territoire, le PFT est la plus répandue en Amérique du Nord. Au Canada, cet arbre s'étend de la Nouvelle-Écosse et le Labrador jusqu'en Colombie Britannique et il est également présent au Yukon (voir Figure 1.5) [2, 66]. C'est un arbre qui a la capacité de croître rapidement puisqu'il s'adapte facilement aux différents climats de l'Amérique du Nord et aussi aux différents types de sols. Le PFT mesure en moyenne entre 16 et 25 mètres et peut atteindre jusqu'à 35 mètres. Ces caractéristiques lui confèrent un intérêt important dans l'industrie du bois depuis les dernières années, en particulier au Québec où il occupe le premier rang parmi les feuillus les plus commercialisés [2, 66]. Aussi, grâce à sa régénération rapide, le PFT joue un rôle important dans la reboisement du territoire après les perturbations des écosystèmes, où il contribue en tant que source de nourriture et en tant qu'habitat pour différentes espèces animales. En effet, cet arbre a pour rôle de réduire le vent qui représente un stress thermique pouvant affecter les animaux. Son système racinaire peu profond et très étendu lui permet d'être utile dans les bandes riveraines afin de rendre les berges immobiles, diminuer l'érosion et conserver la quantité d'eau stable [66, 67].





**Figure 1.5** Le peuplier faux-tremble (*Populus tremuloides*) et sa répartition géographique au Canada. D'après [66, 67].

Depuis très longtemps, le PFT a un rôle à jouer dans la santé humaine et le traitement de maladies. En effet, cette essence a autrefois été utilisée comme agent médicinal par les premières nations Nord-Américaines pour ses propriétés diurétique, anti-infectieuse (dans le cas des infections urinaires), antimicrobienne, tonifiante, etc. Les écorces de PFT ont, entre autres, été utilisées comme agent vermifuge en les broyant puis en les mélangeant avec du sucre avant de les administrer aux individus. Les feuilles ont été utilisées plus particulièrement pour traiter les coupures et les plaies ulcéreuses. Il a également été rapporté que les écorces et les feuilles étaient utilisées pour le traitement de la fièvre [68, 69]. Aujourd'hui, le peuplier occupe une très faible place dans le développement d'agents biologiques destinés à la santé humaine [11].

### 1.3.2 Le PFT dans l'industrie forestière québécoise

Comme mentionné, le PFT occupe une place importante dans l'industrie forestière québécoise aujourd'hui. Les diverses variétés de peuplier représentent à elles seules 8,3 % du commerce forestier au Québec [2]. Bien que dans le passé le PFT a longtemps été considéré comme inutile et sans intérêt, le développement des technologies et des procédés industriels a permis d'augmenter la valeur marchande de cette essence.

En effet, cet arbre est récolté puis transformé, entre autres, en pâtes et papiers, en contreplaqués, en allumettes, en panneaux de lamelles orientées et en composants de palettes. Actuellement, les résidus de sciage (écorces, copaux, sciures et rabotures) issus de l'industrie forestière sont en majorité brûlés pour la production d'énergie. Il existe également d'autres applications pour les résidus de sciage telles que la production de laine de bois, la production de panneaux composites, le compostage et le bioraffinage. Depuis les dernières années, les difficultés financières auxquelles font face les industries forestières poussent ces dernières à s'intéresser aux extractibles pouvant se retrouver dans les résidus de sciage du PFT. En effet, cette biomasse résiduelle est très abondante et accessible mais encore sous-exploitée. Ainsi, l'objectif de ces industries est de pouvoir d'abord extraire un maximum de métabolites actifs des écorces et de récupérer, en deuxième lieu, la matière lignocellulosique pour l'exploiter dans l'une des applications mentionnées précédemment. Ce processus permettrait de valoriser cette biomasse résiduelle à son maximum [2, 70] .

### **1.3.3 La composition chimique et les activités biologiques du PFT**

Depuis quelques années, plusieurs études portant sur la caractérisation chimique des végétaux et leurs activités biologiques ont été réalisées. Le PFT a déjà fait l'objet de quelques études et certaines équipes de recherche se sont intéressées aux MS qu'il produit mais ces études restent très limitées et une importante partie de ses métabolites demeure inexplorées à ce jour.

Une analyse par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) sur des extraits d'écorce de PFT a révélé que cette essence produit plusieurs composés tels que des composés phénoliques, des acides gras, des flavonoïdes, des diglycérides, des stérols, des triterpènes, des stéryls et des lipides [71]. Aussi, des tests colorimétriques permettant de caractériser les extraits d'écorce de PFT ont démontré qu'il produit des composés phénoliques de manière abondante dont quelques-uns sont des flavonoïdes (principalement des flavonols). Il a été déterminé que la majorité de ces composés phénoliques seraient des glycosides [72, 73]. D'autres analyses par GC-MS sur

des extraits de bourgeons de PFT ainsi que sur des extraits de propolis, une matière formée par les abeilles à partir de résine de PFT, ont révélé que ces deux extraits possèdent le même profil de métabolites. Ceux-ci sont majoritairement des phénols qui représentent 4,5 % de la concentration totale en métabolites, mais aussi des acides aromatiques, des acides phénoliques, des terpénoïdes, des cétones aromatiques, des acides benzoïques, des acides gras et des acides organiques [74, 75]. Bien que l'analyse par GC-MS possède de nombreux avantages, elle ne permet pas de caractériser l'ensemble des composés et particulièrement ceux qui sont peu ou pas volatils. Ainsi, puisque les seules identifications effectuées sur les écorces de PFT ont été réalisées selon une analyse par GC-MS, une importante partie des MS synthétisés par le PFT reste encore inconnue.

Les études sur les composés présents chez le PFT ont révélé que cette essence possède plusieurs activités biologiques d'intérêt. En raison de la concentration importante en composés phénoliques, l'une des principales activités biologiques observées chez les extraits de PFT est son activité antioxydante [76]. D'ailleurs, il a été possible d'observer que cette activité est supérieure à celle de l'hydroxytoluène butylé (BHT), un antioxydant synthétique commercial [72]. De plus, le PFT est aussi reconnu pour son potentiel antimicrobien et plus particulièrement sur les bactéries à gram +. Cette efficacité a été démontrée avec des extraits de bourgeons et de propolis de PFT [74, 75]. L'activité antimicrobienne du PFT peut être due à la présence d'acide salicylique, d'acide benzoïque, de cétones aromatiques, d'acides gras et d'acides organiques, des composés ou groupes de composés déjà reconnus pour leur pouvoir antimicrobien [77-79]. Aussi, le chrysophanol, une molécule plus spécifique au PFT qu'aux autres essences retrouvées sur le territoire, a démontré une activité antimicrobienne intéressante contre plusieurs microorganismes pathogènes [75, 80]. Finalement, une étude sur des extraits de feuilles de PFT a démontré que ceux-ci possèdent des propriétés anti-inflammatoires qui seraient potentiellement dues à la présence de flavonols glycosylés et de dérivés de salicine [81].

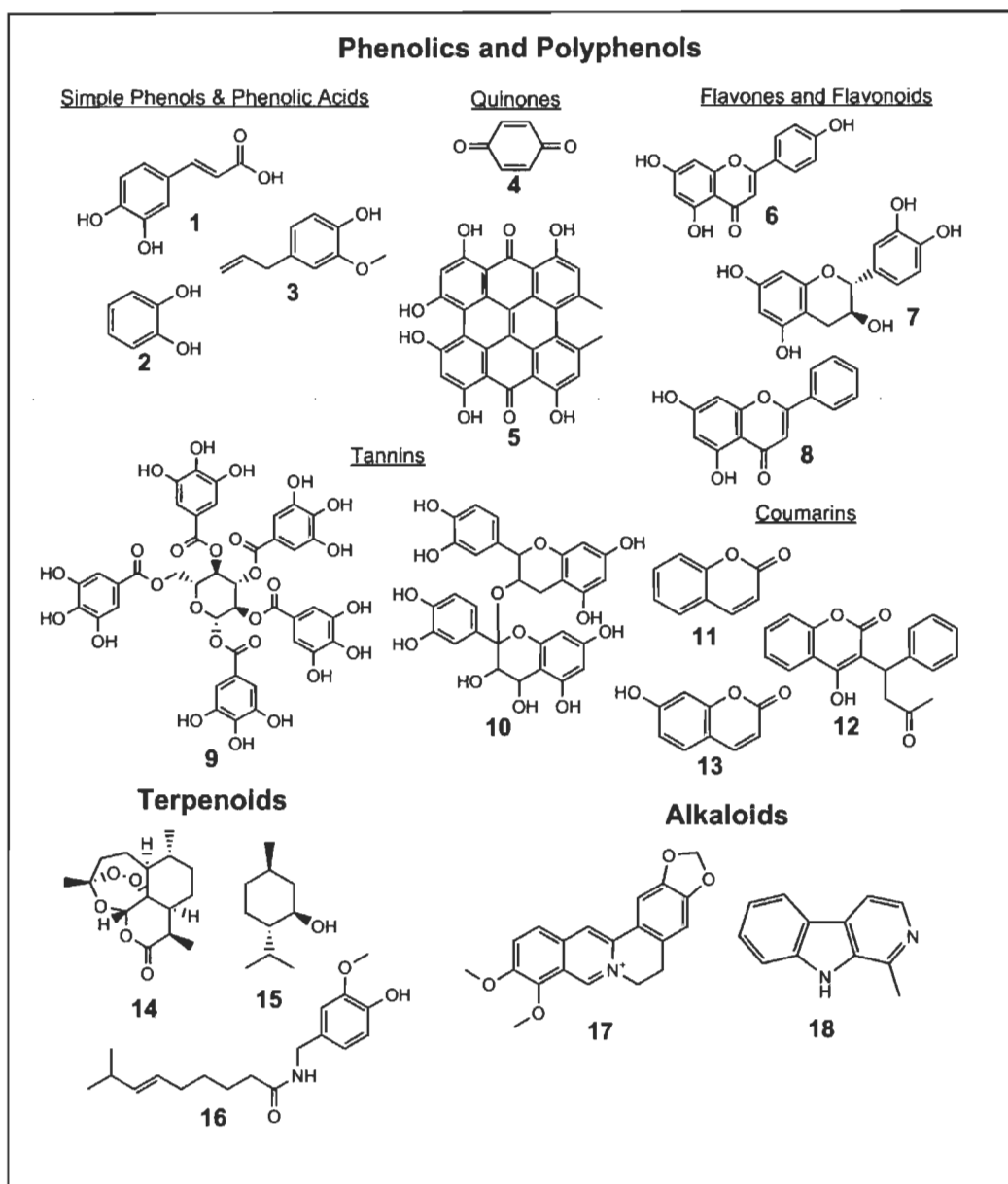
## 1.4 Les antimicrobiens naturels

### 1.4.1 Définitions et généralités

Selon la définition de Santé Canada, un agent antimicrobien correspond à une substance capable de causer la mort cellulaire des microorganismes pathogènes ou inhiber leur prolifération. Lorsque l'agent antimicrobien est capable de tuer le microorganisme, on dit qu'il est bactéricide pour les bactéries, fongicide pour les champignons, virucide pour les virus, etc. Lorsqu'il inhibe la prolifération du microorganisme, on dit plutôt qu'il est bactériostatique, fongistatique, etc. Pour simplifier le texte, les termes bactéricide et bactériostatique seront utilisés pour l'ensemble des microorganismes tués ou inhibés [82]. Le terme « agent antimicrobien » est un terme général qui englobe tous les agents antibactériens, antifongiques, antiviraux et antiparasitaires [83, 84]. Les antimicrobiens portent différents noms selon leur usage. D'abord, un antiseptique est une substance utilisée pour désinfecter les mains et autres tissus vivants. Un désinfectant réfère à une substance servant à désinfecter les objets et les surfaces de contact. Un antimicrobien utilisé comme médicament pour combattre les infections bactériennes chez les humains et les animaux est plutôt un antibiotique. Les antiseptiques, les désinfectants et les antibiotiques peuvent être bactéricides et/ou bactériostatiques et ils n'ont pas nécessairement d'effet sur les spores. À l'inverse, la stérilisation, ou l'usage d'un stérilisant, est un processus qui permet de tuer complètement toutes vies de microorganismes et même les spores. Finalement, un agent de conservation est une substance généralement bactériostatique ajoutée dans les produits alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques pour leur préservation [82, 85]. Contrairement aux désinfectants et antiseptiques qui ont un large spectre d'action en agissant sur une grande variété de microorganismes, les antibiotiques, eux, sont généralement plus spécifiques à une famille de microorganismes [85].

Les antimicrobiens peuvent être (1) naturels, c'est-à-dire des métabolites isolés directement d'organismes vivants tels que les végétaux et les microorganismes (bactéries, mycètes, champignons, microalgues, etc.). Ils peuvent être aussi (2) semi-synthétiques,

soit le résultat d'une modification d'une molécule naturelle pour augmenter son efficacité, sa spécificité, son spectre d'action ou encore pour diminuer les effets secondaires sur la santé humaine. Finalement, certains sont aussi (3) synthétiques, c'est-à-dire produits par synthèse organique en laboratoire [83, 86]. Depuis les années 1970, les méthodes de développement de nouveaux agents antimicrobiens prennent une place importante dans le secteur pharmaceutique. Plusieurs études se concentrent particulièrement sur le développement d'agents antimicrobiens naturels plutôt que synthétiques. En effet, puisque les antimicrobiens naturels ont une structure chimique très complexe, qui est le résultat de millions d'années d'évolution, certains d'entre eux arrivent à facilement pénétrer les membranes des pathogènes et à avoir une plus grande sélectivité sur certaines cibles cellulaires [87, 88]. Le développement d'agents antimicrobiens naturels procure aussi l'avantage de revaloriser la biomasse résiduelle provenant de différentes sources (sous-produits alimentaires, résidus forestiers et agricoles, biomasse marine, etc.). Finalement, puisque les extraits naturels sont formés de plusieurs molécules, ils deviennent de bons candidats pour développer des agents antimicrobiens à large spectre. En effet, il n'est pas rare qu'un extrait soit composé de plus d'une molécule antimicrobienne ce qui peut amener l'extrait à avoir plus d'une cible [38]. À ce jour, approximativement deux-tiers des antibiotiques et autres antimicrobiens thérapeutiques sur le marché sont d'origine naturelle. Ils sont généralement produits par des microorganismes tels que des bactéries et des champignons. Par exemple, l'antibiotique pleuromutiline a été isolé initialement des basidiomycètes *Pleurotus mutilis* et *Pleurotus passeckerianus* ou encore le ramoplanine qui est produit par le champignon *Actinoplanes* [89, 90]. Cependant, encore peu d'antimicrobiens d'origine végétale sont utilisés comme ingrédient actif dans les produits commerciaux bien que plusieurs études rapportent le potentiel de plusieurs plantes dans la synthèse d'antimicrobiens naturels (voir Figure 1.6) [91-93]. À titre d'exemple, le thymol, une molécule provenant du *Thymus vulgaris* est utilisé dans certains désinfectants commerciaux [94]. Aussi, la berberine, un alcaloïde retrouvé dans plusieurs plantes, est vendue comme supplément naturel pour combattre les infections bactériennes et fongiques [95].



**Figure 1.6 Exemples de métabolites naturels d'origine végétale reconnus pour leur potentiel antimicrobien.**

(1) acide caféique, (2) catéchol, (3) eugénol, (4) quinone, (5) hypericine, (6) flavone, (7) catéchine, (8) chrysine, (9) pentagalloylglucose, (10) procyanidine, (11) coumarine, (12) warfarine, (13) 7-hydroxycoumarine, (14) artemisinine, (15) menthol, (16) capsaïcine, (17) berberine, (18) harmane. [93].

### 1.4.2 Problématiques actuelles liées aux antimicrobiens

Partout dans le monde, les infections bactériennes, fongiques à levure font partie des principales causes de décès chez l'humain. Ces infections représentent un défi de taille dans le secteur de la santé publique et celui-ci est accentué par l'émergence constante de microorganismes résistants aux antimicrobiens conventionnels. En effet, l'évolution, par des modifications génétiques (mutations) chez les microorganismes, favorise leur survie. Par exemple, le microorganisme peut devenir résistant suite à la modification de la cible moléculaire de l'antimicrobien (la cible n'est plus reconnue) ou encore par l'expression de nouvelles enzymes capables de bloquer l'activité de l'antimicrobien [83, 96]. Outre les mutations aléatoires, les microorganismes peuvent se transférer de l'ADN sous forme de plasmide et donc, par le fait même, transférer des gènes de résistances [95, 96]. Ce phénomène de résistance acquise a été perçu pour la première fois dans les années 1940 chez la bactérie *Staphylococcus aureus* suite à l'introduction de la pénicilline G en clinique. Pour remédier à la situation, plusieurs autres antibiotiques, tels que la méthiciline, ont été développés pour combattre la souche résistante. Ces efforts ont cependant mené à l'émergence de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthiciline (SARM), l'une des plus importantes sources d'infection en milieu hospitalier [83, 97]. Aujourd'hui, le phénomène de résistance est aussi observé chez d'autres pathogènes, principalement chez les « ESKAPE » pathogènes (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter spp.*) [95, 98]. Plusieurs ouvrages suggèrent que ce problème est causé principalement par la prescription abusive d'antibiotiques, ainsi que l'utilisation intensive d'agents antimicrobiens en agriculture pour la production de bétails dans les dernières décennies [83, 96, 99]. Cette problématique est donc l'une des principales sources de motivation dans la recherche et le développement de nouveaux désinfectants, antibiotiques, antiseptiques, etc.

Aussi, les problèmes liés à l'utilisation d'antimicrobiens synthétiques motivent plus particulièrement le développement d'antimicrobiens d'origine naturelle. D'abord, la synthèse de molécules synthétiques ayant des propriétés antimicrobiennes est souvent plus



coûteuse et ces molécules peuvent avoir des répercussions importantes sur l'environnement et les écosystèmes. Par exemple, les composés d'ammoniums quaternaires (CAQ) sont des antimicrobiens synthétiques couramment utilisés dans les désinfectants qui agissent comme des toxines pour les populations de protozoaires et de crustacés lors de leur rejet dans les eaux usées [100, 101]. L'acide *per*-acétique et les composés chlorés utilisés comme désinfectants industriels ont également démontré une toxicité dans les eaux usées [102].

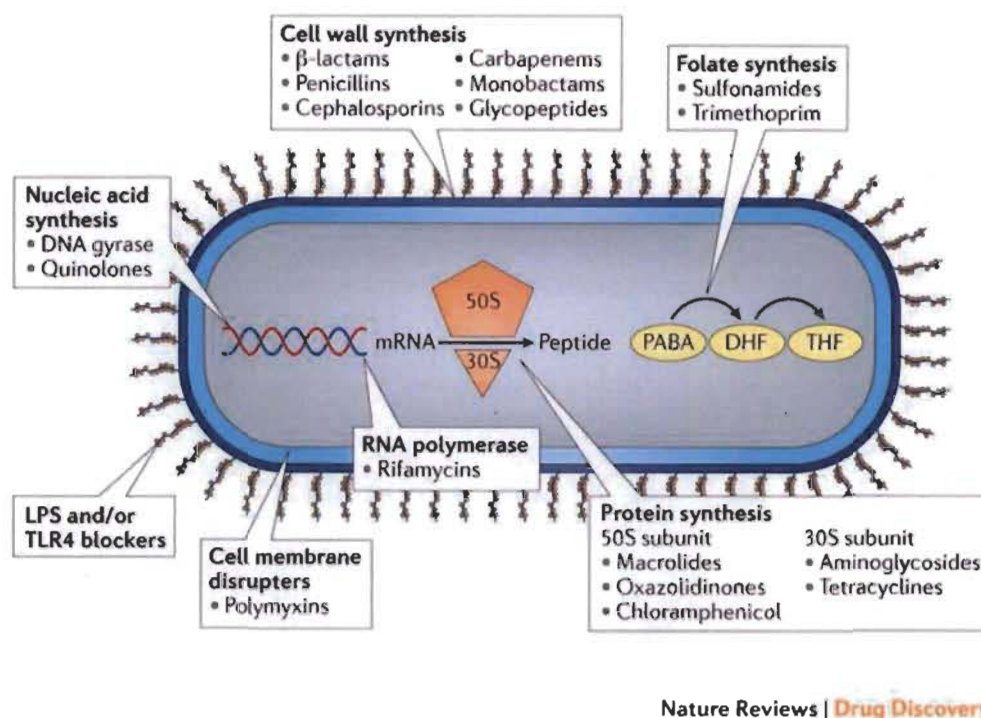
Les problématiques rapportées dans le paragraphe précédent font en sorte que le développement de nouveaux agents antimicrobiens est un axe de recherche en perpétuelle croissance. En effet, il s'avère nécessaire de développer des molécules ayant de nouveaux mécanismes d'action pour lesquels les microorganismes n'ont pas développé de résistance et plus précisément des molécules ayant une forte sélectivité pour les cellules de microorganismes pathogènes afin d'éviter les effets secondaires et la toxicité chez les cellules mammifères. Finalement, il est également souhaitable de développer des agents qui ne nécessitent pas de méthodes dispendieuses et polluantes pour les produire à grande échelle.

### 1.4.3 Les mécanismes d'action des antimicrobiens

Les composés antimicrobiens affectent la viabilité des cellules de bactéries, champignons (levures et moisissures) et autres pathogènes par différents mécanismes d'action. Dans la plupart des cas, la structure et les groupes fonctionnels présents chez les molécules antimicrobiennes expliquent pourquoi elles ont des cibles moléculaires distinctes. Cependant, dans tous les cas, les antimicrobiens agissent sur des processus essentiels à la survie ou à la prolifération du ou des microorganismes ciblés. Selon le processus qu'ils inhibent, les antimicrobiens peuvent être séparés en plusieurs catégories de mécanismes d'action (voir Figure 1.7). D'abord, plusieurs agents antimicrobiens agissent au niveau de la synthèse de la paroi cellulaire. Un exemple de mécanisme d'action connu est celui des antibiotiques pénicilline et céphalosporine qui inhibent l'activité des transpeptidases ce qui empêche la synthèse des peptidoglycanes, des composants



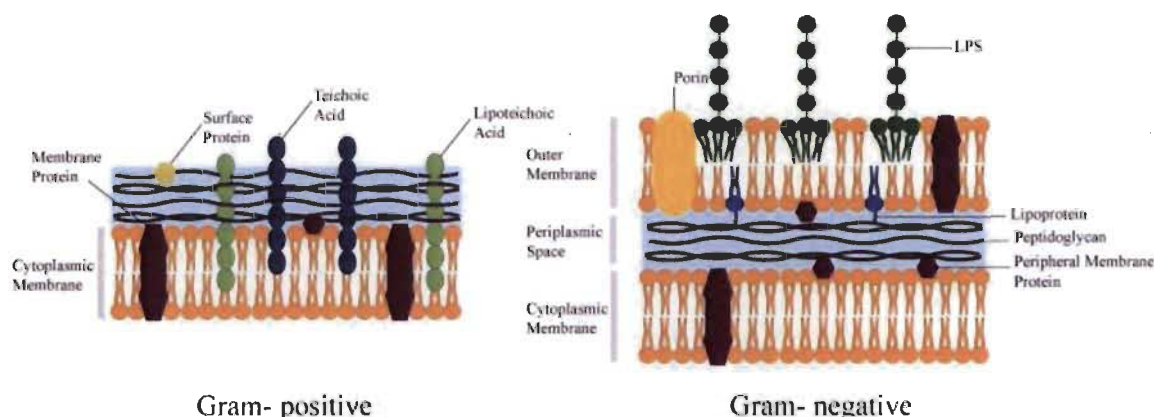
essentiels de la paroi cellulaire des bactéries. Deuxièmement, les antimicrobiens peuvent avoir un effet au niveau de la synthèse des protéines en inhibant l'une des étapes de la traduction. Par exemple, les aminoglycosides sont des molécules capables de se lier irréversiblement au site A des ribosomes, empêchant ainsi la traduction de l'ARN messager en protéine. Aussi, d'autres antimicrobiens agissent au niveau de la réplication et de la transcription de l'ADN. Un exemple d'antimicrobiens connus pour inhiber ces processus sont les quinolones. Ces molécules ciblent deux enzymes nécessaires à la régulation de l'enroulement et l'ouverture de l'ADN double-brin, soit les topoisomérases II et IV. Certains antimicrobiens altèrent l'intégrité de la membrane cellulaire des microorganismes. Par exemple, la molécule polymyxine interagit avec les phospholipides de la membrane et augmente ainsi la perméabilité de cette dernière. Cela a pour effet de laisser pénétrer les agents toxiques à l'intérieur de la cellule et causer des fuites d'ions. Les fuites d'ions viennent dépolariser la membrane et altérer le transport membranaire [84, 103]. Il y a également d'autres antimicrobiens qui agissent aussi au niveau de la membrane en bloquant les lipopolysaccharides (LPS), des endotoxines retrouvées à la surface de la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif. Les LPS sont très nuisibles pour les cellules mammifères car leur relâchement cause une réponse inflammatoire démesurée pouvant causer la mort. Le peptide cathélicidine est un bon exemple d'antimicrobien qui bloque les LPS [104]. Finalement, certains agents antimicrobiens ont la capacité d'interférer dans l'une des voies métaboliques essentielles chez le microorganisme, soit la voie de synthèse de l'acide folique, un précurseur des nucléotides. Les sulfonamides sont des molécules capables d'entrer en compétition avec le substrat de l'enzyme dihydroptéroate synthetase et bloquent ainsi la synthèse de l'acide folique [84, 103].



**Figure 1.7** Mécanismes d'action des composés antimicrobiens sur les microorganismes pathogènes et exemples d'antibiotiques associés à chacun d'eux [95].

Finalement, le mécanisme d'action est ce qui explique pourquoi certains types de pathogènes possèdent une résistance intrinsèque à un antimicrobien alors que d'autres sont vulnérables. En effet, en raison de leurs traits structurels et/ou fonctionnels, certains microorganismes deviennent une cible moléculaire pour l'antimicrobien. Par exemple, un antimicrobien ciblant les LPS aura un effet plus important sur les bactéries à Gram négatif puisque les bactéries à Gram positif ne possèdent pas ces molécules à la surface de leur paroi cellulaire (voir Figure 1.8). À l'inverse, des antimicrobiens ciblant la synthèse des peptidoglycanes auront un effet principalement sur les bactéries à Gram positif et un effet moindre sur les bactéries à Gram négatif puisque ces dernières possèdent une membrane externe alors que chez les bactéries à Gram positif les peptidoglycanes sont directement en contact avec le milieu extracellulaire (voir Figure 1.8) [84, 105]. Le mécanisme d'action peut également expliquer pourquoi certains antimicrobiens ont un effet bactéricide alors que d'autres ont un effet bactériostatique sur un pathogène donné. En général, un composé antimicrobien qui lie sa cible de manière irréversible ou bien avec

une très forte affinité aura tendance à avoir un effet bactéricide, alors qu'un composé qui forme des liens instables aura plutôt un effet bactériostatique. Cet effet peut tout de même varier en fonction de la concentration de l'agent antimicrobien, du stade de croissance du pathogène et des conditions environnementales [84].



**Figure 1.8** Différences structurales entre la membrane cellulaire d'une bactérie à Gram positif (à gauche) et une bactérie à Gram négatif (à droite) [105].

## 1.5 Objectifs de recherche et hypothèses

Vu la nécessité grandissante de développer de nouveaux composés antimicrobiens naturels pour contrer les phénomènes de résistance, il devient nécessaire d'étudier plus rigoureusement le potentiel antimicrobien des MS des végétaux. Considérant qu'au Québec les résidus forestiers sont abondants, accessibles et sous-exploités, ceux-ci correspondent à une biomasse de choix pour le développement d'agents antimicrobiens. Plus précisément, le PFT est une essence d'arbre intéressante pour cette application vu les études rapportant son potentiel dans la biosynthèse de plusieurs MS pouvant avoir des propriétés antimicrobiennes, tels que des polyphénols, acides phénoliques, flavonoïdes, etc. Subséquemment, l'objectif général des travaux de recherche présentés vise l'étude de la composition chimique des extractibles des écorces du PFT et l'évaluation de l'activité antimicrobienne de ces derniers. Pour répondre à cet objectif, différentes extractions sur les résidus de sciage du PFT seront réalisées. Une évaluation de l'activité antimicrobienne de ces différents extraits sera réalisée par microdilution en bouillon. Finalement, une

caractérisation phytochimique de ceux-ci sera réalisée à l'aide de deux méthodes pour tenter d'identifier les composés potentiellement responsables de l'activité antimicrobienne. D'abord une caractérisation plus grossière des familles de composés sera réalisée par chromatographie sur couche mince (CCM) puis une identification spécifique des composés sera effectuée par chromatographie liquide ultra performance couplée à un spectromètre de masse quadripolaire à temps de vol (UPLC-QTOF-MS).

Concernant les hypothèses de ces travaux de recherche, il est attendu que plusieurs MS contenus dans les écorces de PFT auront des propriétés antimicrobiennes sur plus d'un microorganismes pathogènes. Il est également attendu que l'utilisation de différents solvants d'extraction permettra d'obtenir des profils chimiques variés pour chacun des extraits. De ce fait, les différents extraits n'auront pas la même efficacité antimicrobienne sur les différents pathogènes en raison de la diversité des molécules qu'ils contiennent.

L'originalité de ces travaux de recherche réside dans son aspect innovateur. En effet, aucun agent antimicrobien parmi ceux commercialisés actuellement ne provient d'une essence d'arbre québécoise. Ceci peut s'expliquer par le fait que très peu d'études se sont attardées à l'activité antimicrobienne des essences d'arbre du Québec jusqu'à ce jour. Plus précisément, peu d'études se sont intéressées aux activités biologiques du PFT en fonction de sa composition chimique. Ces travaux de recherche pourraient permettre, à plus long terme, d'utiliser un type de biomasse sous-exploité en plus de tenter de diminuer les impacts environnementaux liés à plusieurs antimicrobiens utilisés actuellement.

## CHAPITRE II

### CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE DES EXTRAITS DE PEUPLIER FAUX-TREMBLE (*POPULUS TREMULOIDES*) PAR UPLC-QTOF-MS ET ÉVALUATION DE LEUR ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE

Le contenu de ce chapitre est écrit sous la forme d'un article scientifique qui a fait l'objet d'une publication, en anglais, dans la revue « Molecules », en juillet 2018.

#### 2.1 Contribution des auteurs

L'ensemble des manipulations ayant menées aux résultats présentés dans cet article a été réalisé par Annabelle St-Pierre avec l'aide de Dorian Blondeau, également étudiante à la maîtrise en biologie cellulaire et moléculaire dans le laboratoire d'Isabel Desgagné-Penix. La recherche bibliographique, l'établissement de la problématique et des objectifs de recherche ainsi que l'élaboration de la démarche méthodologique pour répondre aux objectifs ont été déterminés par Isabel Desgagné-Pénix (Directrice de maîtrise), André Lajeunesse (Co-directeur de maîtrise), Nathalie Bourdeau (Chercheuse associée) et Julien Bley (Chercheur associé). La rédaction de ce manuscrit ainsi que la conception des figures et des tableaux ont également été complétées par Annabelle St-Pierre. Les corrections finales de ce manuscrit ont été effectuées par Nathalie Bourdeau, Isabel Desgagné-Penix et André Lajeunesse.

## 2.2 Résumé de l'article

Actuellement, l'émergence continuelle de microorganismes pathogènes résistants aux agents antimicrobiens est un défi récurrent qui mènent à l'étude des antimicrobiens naturels d'origine végétale. Ces études sont également motivées par la perte d'intérêt envers les antimicrobiens synthétiques afin de limiter les impacts négatifs sur l'environnement. Cette étude visait donc le potentiel antimicrobien des MS de résidus de peuplier faux-tremble (*Populus tremuloides*) du Québec. Pour atteindre cet objectif, plusieurs extractions à l'aide de différents solvants ont été réalisées et l'activité antimicrobienne de ces extraits a été évaluée sur huit microorganismes pathogènes différents. Les résultats ont révélé que l'utilisation d'un solvant polaire tels que l'eau, l'éthanol ou le méthanol permet un meilleur rendement en extractibles (>15,07 %). Les résultats de MIC et MBC/MFC ont démontré que l'extrait à l'eau avait l'activité antimicrobienne la plus élevée en inhibant la croissance de tous les microorganismes étudiés et en ayant un effet bactéricide sur trois d'entre eux. Une efficacité intéressante a également été observée avec l'extrait au méthanol qui a inhibé trois microorganismes et qui a eu un effet bactéricide sur l'un d'eux. L'analyse par UPLC-QTOF-MS a permis d'identifier 92 composés, principalement des polyphénols dans les deux extraits, dont 22 sont rapportés dans la littérature pour leur propriété antimicrobienne. En fonction de leur abondance relative, le 4-hydroxybenzaldéhyde (5,44 % de l'extrait au méthanol) et le kampferol (5.03 % de l'extrait à l'eau) semblent être les composés antimicrobiens les plus abondants. Parmi les 22 molécules antimicrobiennes, neuf font partie de la classe des flavonoïdes. En conclusion, l'ensemble des résultats démontre l'intérêt d'utiliser le PFT comme source de composés antimicrobiens.

### 2.3 Article scientifique

#### **Phytochemical screening of quaking aspen (*Populus tremuloides*) extracts by UPLC-QTOF-MS and evaluation of its antimicrobial activity**

Annabelle St-Pierre<sup>a</sup>, Dorian Blondeau<sup>a</sup>, André Lajeunesse<sup>a</sup>, Julien Bley<sup>b</sup>, Nathalie Bourdeau<sup>b,c</sup> and Isabel Desgagné-Penix<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Chemistry, Biochemistry and Physics, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, Canada.

<sup>b</sup>Innofibre, Trois-Rivières, Québec, Canada.

<sup>c</sup> Groupe de Recherche en Biology Végétale (GRBV).

\*Corresponding author:

Desgagné-Penix, I., Department of Chemistry, Biochemistry and Physics,  
Université du Québec à Trois-Rivières, 3351 boul. des Forges, Trois-Rivières, QC, G9A  
5H7, Canada.

(Tel : 819-376-5011, Fax : 819-376-5014).

E-mail : Isabel.Desgagne-Penix@uqtr.ca

**Keywords:** Quaking aspen, *Populus tremuloides*, antimicrobial activity, UPLC-QTOF-MS, phenolic compounds, flavonoids.

## Abstract

The continual emergence of pathogen resistance to antimicrobial agents is a recurring challenge and the current concern about synthetic antimicrobial compounds to limit negative environment impact lead to the study of natural antimicrobial molecules. Here was investigated specialized (*aka* secondary) metabolites of quaking aspen tree (*Populus tremuloides*) growing in Quebec as potential antimicrobial agents. To achieve this aim, several extractions using different solvents were realized and corresponding antimicrobial activity was tested against eight microorganisms. Results revealed that using polar extraction solvents such as water, ethanol and methanol gave the best yields (>15.07%). Minimal inhibition concentration (MIC) and minimal bactericidal/fungicidal concentration (MBC/MFC) results demonstrated that water extracts had the best antimicrobial activity by inhibiting the growth of all tested microorganisms in addition to having a bactericidal effect on three of them. An interesting efficiency was also observed with the methanol extract causing the inhibition of three microorganisms and having a bactericidal effect on one of them. Ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of flight mass spectrometry (UPLC-QTOF-MS) analysis led to the identification of 92 compounds, mainly polyphenols in both polar extracts, with 22 molecules previously known for their antimicrobial properties. According to the relative abundance, 4-hydroxybenzaldehyde (5.44%, in methanol extract) and kaempferol (5.03% in water extract) were the most abundant antimicrobial compounds. Among antimicrobial molecules identified, nine were from the flavonoid family. The results of our study demonstrate the interest of using quaking aspen as source of antimicrobial compounds.



## Introduction

Continual emergence of resistant pathogens to antibiotics, antiseptics and disinfectants is a real challenge and it motivates innovation in the field of antimicrobial agent development [106, 107]. This research field is in perpetual expansion in order to discover new molecules with antimicrobial activity. Although synthetic antimicrobial agent development has largely contributed to the field, the current environment concerns coupled with the need to deal with our natural resource residues has prompted a renewed interest toward natural antimicrobial molecules. Thus, it is relevant to look at plant specialized (*aka* secondary) metabolites known for their biological and therapeutic activities. Indeed, several current studies are using this alternative approach to investigate molecules produced by plants with the purpose of developing antimicrobial agents. In fact, it was estimated that there are around 25% of prescribed drugs on the market that come from plant metabolites [108, 109].

Quaking aspen (*Populus tremuloides*) is a tree largely present in the boreal forests of North America and is poorly studied and exploited for its biological properties. This broadleaf tree exhibits the largest spatial distribution of all deciduous species in Canada. It stretches from Newfoundland and Labrador to British Columbia and the Yukon [2]. Quaking aspen was formerly used in traditional medicine by Native American nations for its various therapeutic functions, either as a vermifuge, to treat venereal disease, an anti-arthritis agent or as a cure for colds [2, 70]. Since some of these applications suggest antimicrobial activities, quaking aspen has potential in the development of antimicrobial agents through the extraction of its specialized metabolites. Previous studies on the chemical composition of quaking aspen have revealed that this species is an important source of extractive compounds, *i.e.* molecules easily extractive with a solvent. It was reported that quaking aspen trees are rich in polyphenols, but also in sterols, sterols, triterpenes and alkaloids [71, 72, 110]. Polyphenols and alkaloids are families of compounds highly sought for their antioxidant, antitumor and antimicrobial activities [39, 111-113]. These classes of compounds are recognized to be synthesized by plants to protect themselves against biotic stress. These molecules, according to their chemical

structure, can act as toxins that alter biological processes of predators such as herbivores, fungi or bacteria [29, 30]. Triterpenes are also known for their antimicrobial potential and are often involved in plant defense mechanisms against pathogens [48, 114, 115]. Currently, there are very few studies linking specialized metabolites of quaking aspen to biological activities of interest. It would be advantageous to characterize specialized metabolites of this species and their respective antimicrobial efficiency.

The residual biomass of quaking aspen still remains sparsely exploited and valued while it is very abundant and easily accessible. Currently in Quebec, this tree is mainly used by the forest industry for its transformation into pulp and paper, lumber and building materials [2, 70]. During the industrial process of sawing wood, residues such as bark, knots and small branches are removed from the sapwood and discarded because of high content of undesirable compounds (lignins, polyphenols and resins) which contribute to low mechanical properties in the manufacture of lumber [6]. In this way, a significant volume of wood residues remains unexploited while they contain a large proportion of interesting metabolites. Since bark residues contain a lot of lignocellulosic compounds rich in organic matter, they are commonly burned and used as a bioenergy source. In some cases, barks ends up buried in the ground and are not valued [8, 116]. Thus, it is necessary to focus on quaking aspen in a context of forest residue management and valorisation through the potential antimicrobial activities that its metabolites can offer.

Thus, the objective of this study was to evaluate the antimicrobial potential of quaking aspen through its active specialized metabolites extracted from bark residues. To achieve this goal, the general composition and extractive yield of different fraction sizes of bark residues were determine and multiple solvents extractions for optimal yield of bioactive metabolites were performed. Next, the families of compounds present in the extracts were screened qualitatively using thin layer chromatography (TLC) analysis and specific compounds were identified using ultra-performance liquid chromatography time of flight quadrupole mass spectrometry (UPLC-QTOF-MS) analysis. Antimicrobial activity was then evaluated *in vitro* by determining the minimal inhibition concentration (MIC) and the minimal bactericidal/fungicidal concentration (MBC/MFC) of extracts.

These were evaluated on different bacterial and fungal strains including three Gram-negative bacteria, two Gram-positive bacteria and three fungi (two yeasts and one mold). The comparative analysis of the chemical composition of the extracts with their antimicrobial activity support the use of quaking aspen as a potential antimicrobial source.

## Experimental

### *Plant material*

The plant material used for this experiment was quaking aspen (*Populus tremuloides*) bark, obtained from sawmill residues of T.L.T Industry in Ste-Monique, Lac-St-Jean, Quebec, Canada on winter 2016 and winter 2017. The material was dried after reception at room temperature (~20 °C) to preserve it until extraction.

### *Microbial strains*

The bacterial and fungal strains were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and from the microbiology laboratory of the Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR). The microorganisms used were *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Salmonella enterica* (ATCC 10708), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Aspergillus niger* (ATCC 10535), *Candida albicans* (from UQTR microbiology laboratory), *Saccharomyces cerevisiae* (from UQTR microbiology laboratory). The bacterial strains were grown on sterilized Mueller Hinton agar and incubated at 37 °C during 24 h while the fungi strains were grown on Sabouraud dextrose agar and incubated at 37 °C also during 72 h before use.

### *Determination of barks composition and extractives yield per fraction size*

To determine the general composition and extractives yield of quaking aspen barks residues per fraction size, sieving was first performed. The following sieve mesh sizes were used: 3 mm, 7 mm, 45 mm, to obtain four different fractions: (a) < 3 mm, (b) 3-7

mm, (c) 7-45 mm, (d) > 45 mm. The bark was then grind with a Wiley Mill crusher at 0.425 mm for further extractions and analysis.

For the general composition, procedures from the National renewable energy laboratory (NREL) were carried out. Specifically, the NREL/TP-510-42620 and NREL/TP-510-42622 protocols were followed on fraction size < 3 mm and > 3 mm to dry and weigh the total biomass, and to calculate ash abundance, respectively. A water and ethanol (85.75% EtOH, 13.7% MeOH, 0.85% ethyl acetate; Fisher scientific) extraction with an accelerated solvent extraction apparatus (ASE) was carried out for the determination of extractible abundance on fractions > 3 mm following protocol NREL/TP-510-42619. Finally, determination of the structural compounds abundance was realized on fractions > 3 mm following the NREL/TP-510-42618 protocol with some modifications. Cellulose and hemicellulose were fractioned by acid hydrolysis and quantification of the monomeric sugars was realized by ionic chromatography (Dionex ICS-5000) with a Dionex CarboPac SA-10 column while lignin was quantified by spectrometry UV-VIS (Hach DR6000) [12].

To determine which particle size fraction of raw bark residues contains the highest amount of extractives, three aliquots of 100 g of each fraction (3-7 mm, 7-45 mm, > 45 mm) was used to perform extraction using an ASE apparatus with three different solvents: (1) distilled water, (2) water-ethanol and (3) ethanol. The yield was determined by measuring the extractive material mass for each fraction.

#### *Extractives yield according to molecule's polarity*

Bark residus fraction size over 3 mm were used to prepare ten aliquots of 10 g of dried bark powder (0.425 mm). Each of them was extracted with different solvents having distinct polarities: (1) distilled water, (2) methanol (99.9%; HPLC-grade; Fisher scientific), (3) denaturised ethanol, (4) acetone (99.8%; Fisher scientific; certified ACS), (5) methylene chloride (>99%; Acros organics), (6) ethyl acetate (99.6%; Acros organics; certified ACS), (7) chloroform (99.9%. Acros organics), (8) hexane (99.9%; Fisher

chemical; HPLC-grade), (9) water-ethanol, and (10) by specific solvents for acid-base extraction method. For samples 3, 4, 5, 6, 7 and 8, the extraction was done with a Soxhlet system for 7 h over six cycles of extraction. For samples 1, 2 and 9, the extraction was performed using ASE. The water extraction was performed during 70 min (6 cycles of 10 min), at 100 °C and at a pressure of 1500 psi and the ethanol extraction was performed during 45 min (6 cycles of 5 mins) at 120 °C and 1500 psi. For the water-ethanol extraction, the matrix was first extracted with water and then extracted with denaturated ethanol with the same parameter as mentioned before according to each extraction solvents. Finally, the acid-base extraction method (liquid-liquid extraction) was performed as described by Yubin *et al.*(2014).

The extraction yield was determined by measuring the dried extractive material mass for each solvent. After that, each extract was suspended in two aliquots, one in DMSO for antimicrobial analysis (99.8%; Fisher scientific; certified ACS) and the other in their respective solvent of extraction for chemistry analysis, both at a concentration of 10 mg/ml. These stock solutions were stored in fridge at 4 °C until further analyzes. All extractions were performed in triplicate.

#### *Thin layer chromatography method (TLC)*

For a quick visualization of the extract's chemical profile, a TLC analysis was carried out. For this purpose, a TLC plate (silica gel 60 F<sub>254</sub> in aluminium) with a dimension of 14x20 cm was used. A solution with standards belonging to different families of compounds such as piperine, betulin, vaniline, ferrulic acid and glucose, all at 1000 ppm, was prepared. Development was realized in a presaturated solvent chamber with CHCl<sub>3</sub>-MeOH-EtOH (90:9:1). For visualisation purpose, the TLC plate was first observed under UV light at 254 nm and also sprayed with *p*-anisaldehyde reagent, following by heating revelation on a hot plate at 105 °C for 5 min. This solution was beforehand prepared by following the mixture proposed in Prado and Meireles (2010) [118]. A similar procedure of TLC plate development was further performed, but sprayed with different reagents: FeCl<sub>3</sub> (for phenolic compounds revelation) using a modified

method based on protocol from SiliCycle Inc. (2017) by mixing 1.6 g of  $\text{FeCl}_3$ , 50 ml of water and 50 ml of methanol, and secondly with Dragendorff (for alkaloids revelation) following the mixture proposed by Jia and Tian (2009) [119, 120].

*Antimicrobial activity test by broth microdilution method*

To determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of extracts, a broth microdilution method described in documents M07-A7 and M38-A2, adapted from the Clinical and Laboratory standard institute (CLSI), have been use [121, 122].

In first, microbial colonies were collected from an agar plate and suspended in a sterilized solution of physiological water (9 g of NaCl in 1 L of distilled water) to obtain final cell concentration of 0.5 Mc Farland, corresponding to  $1.5 \times 10^8$  CFU/ml for bacteria,  $1.5 \times 10^6$  CFU/ml for yeasts and  $1.5 \times 10^4$  CFU/ml for molds. In a 96-well plate, 100  $\mu\text{L}$  of tested extracts in DMSO solution (10 mg/ml) was deposited in wells of the first column. 50  $\mu\text{L}$  of Mueller Hinton broth was added in each well and a serial dilution was realized by transferring 50  $\mu\text{L}$  of the first well into the second of the same row and so on to obtain serial dilution of the extracts ranging between 4.44 to 0.01 mg/ml. 50  $\mu\text{L}$  of the microbial inoculum (0.5 Mc Farland) was then added to the wells. In each microplate test, a positive control of quaternary ammonium compound (QAC) BTC 6358 solution (1.19 g/L) obtained from the sanitation products company Sani Marc (Victoriaville, Qc, Canada) was used. The plate was incubated at 37 °C during 3 h for the bacterial strains and during 6h for fungal strains. After incubation, a solution of INT (2-p-iodophenyl-3-p-nitrophenyl-5-phenyl tetrazolium chloride, Sigma) at 2.85 mg/ml was added. This tetrazolium salt, reduce to a formazan red dye by the coenzyme NADH of living cells, served as cell viability indicator. The plate was incubated a second time for reducing the tetrazolium salt (1 h for the bacterial strains/16 h for the fungal strains). The MIC (minimum inhibitory concentration) was determined in the first well of the serial dilution where no color appear, which indicates that there is inhibition of microbial proliferation. The non-toxic effect of DMSO at 33 % (maximal concentration used during microdilution test) was evaluated and

the absence of inhibition effect confirmed the non-toxic effect of the matrix used to dilute the extracts.

To optimise the protocol, a screening was realized initially with each bark extracts to determine quickly which ones provided the inhibition of microbial proliferation at maximum concentration (4.44 mg/ml), and only effective extracts were kept for the microdilution analysis. For determination of the minimum bactericidal/fungicidal concentration (MBC/MFC), 100  $\mu$ L of each wells containing extracts with positive effect on proliferation during the microdilution broth test were plated on agar surface with their respective growth medium (Mueller Hinton for bacteria and Sabouraud dextrose for fungi). The petri dishes were incubated at 37 °C during 24 h for the bacterial strains and 72 h for the fungal strains. The MBC and MFC were determined by the lowest concentration that allows no visible colony on the agar petri dish i.e., more than a 99.9% reduction in colonies.

#### *UPLC-QTOF-MS method*

UPLC-QTOF-MS analyses were carried out externally by the industrial research center of Quebec (CRIQ). Briefly, analysis was performed with a Waters Acquity ultra-performance LC system (Waters). This apparatus is equipped with a binary pump system model (Waters). The separation was achieved using an Ethylene Bridged Hybrid (BEH) C18 column (100 mm x 2.1 mm id. x 1.7 mm particle size) also from Waters. The UPLC system was coupled with a Waters QTOF micro mass spectrometer equipped with a z-spray electrospray interface for the MS analysis. The mobile phase used was made of two eluents: A = 0.2% acetic acid, B = acetonitrile (99.9% HPLC grade). Elution parameters were as follows: solvent flow rate 0.2 ml/min; injection volume 10  $\mu$ L; proportions of eluent B: 2% (0-1 min); 2-100% (1-30 min); isocratic 100% (30-33 min); 100-2% (33-33.5 min), isocratic 2% (33-40 min). The MS analysis was performed in both positive and negative ionization modes and the data acquired from  $m/z$  100 to 1250 without collision. The conditions of ionization source was established as follows: source temperature 120 °C; cone gas flow rate 50 l/h; desolvation gas flow rate 350 l/h; desolvation gas

temperature 200 °C; cone voltage 30 V in negative mode and 70 V in positive mode; capillary voltage 1150 V in negative mode and 1800 V in positive mode. Ultra high purity nitrogen (99%) was used as a nebulizing gas. Data acquisition carried out with the Masslynx 4.1 software. Mass extraction, deconvolution, isotopes and library search was performed using MZMine 2.0 according to Pluskal *et al.* (2010) [123]. The molecules identifications was determined by the concordance of the  $m/z$  values with the theoretical values using different libraries database: Chempider, Kegg Compounds Database, LipidMaps Database and the CRIQ database.

### *Statistical analysis*

One-way analysis of variance ANOVA was performed on data with a 5% level of probability ( $P < 0.05$ ) using JMP software followed by pairwise mean comparison Tukey test where difference was detected.

## **Results**

### *Determination of Quaking Aspen bark composition and extractive yield per fraction size*

Ash provides an indication of undesirable inorganic components present in wood. These compounds are not extractive material and their abundance can affect the extractive yield. As shown in figure 1A, the ash content in fraction size  $< 3$  mm are higher than the fraction over than 3 mm with an average proportion of 4.67% m/m and 2.97%, respectively.

An evaluation of the relative composition in ash, lignin, cellulose, hemicellulose and extractive content of barks was also carried out according to NREL protocols on each fraction over 3mm. In Fig. 1B, the results show that the bark residues had a significant amount of lignin (25% m/m) and cellulose (23% m/m), a non-negligible amount of extractive material (17% m/m) and, conversely, a low amount of ash (3% m/m).



To identify which fractions size contained the largest proportion of extractives for further optimization of the yield, barks of quaking aspen were beforehand sifted in different granulometric fractions (< 3, 3-7, 7-45 and > 45 mm) before being extracted with three solvents (water, ethanol and water-ethanol). The extractives mass yield (g/100g) obtained for the different granulometric fractions are summarized in Fig. 1C. The results show that the 7-45 mm fraction yielded a greater proportion of extractive materials compared to other fractions, and this result is observed for the three different extraction solvents. The fraction < 3 mm generally showed the lowest yield compared to the fraction 3-7 mm and > 45 mm.

#### *Extractive yield according to molecule polarity*

The extraction was carried out with solvents of different polarity (water, methanol, ethanol, acetone, ethyl acetate, chloroform, methyl chloride, hexane, water-ethanol and acid-base extraction), in order to extract most of the specialized metabolites. The results in Fig. 1D indicate that the solvent generating the highest yields were polar solvents with methanol showing the highest followed by ethanol and water. Methanol and ethanol extractions produced a significantly higher yield than the less polar solvents (chloroform, methylene chloride and hexane) and the multistage extraction method (water-ethanol and acid-base extraction;  $P < 0.05$ ). Based on the physicochemical properties of alkaloids, the acid-base extraction is specifically used to obtain extracts enriched with alkaloids. However, the acid-base extracts displayed a significantly lower yield compared to the other extraction methods.

#### *Thin Layer Chromatography (TLC) analysis*

Initially, the chemical profile of Quaking Aspen bark extracts was determined using thin layer chromatography coupled with different revelation methods. Compounds of the same family have, in the majority of cases, similar polarities, and thus may have a comparable retention factor ( $R_f$ ) value. Also, compounds from the same family will be revealed in the presence of specific revelation agent. Fig. 2 shows the chemical profile of the extracts according to different revelation methods. Overall, polyconjugated

compounds were revealed under UV light at 254 nm (Fig. 2A). The majority of compounds were observable in different colors using the *p*-anisaldehyde reagent, an universal stains for nucleophile and oxygenated compounds (Fig. 2B), phenolic compounds were revealed in orange color using the  $\text{FeCl}_3$  reagent (Fig. 2C), and the Dragendorff exposed nitrogenous compounds such as alkaloids (data not shown) [119].

The three TLC plates in Fig. 2 show that the chemical profile was very similar for (1) water extract, (2) methanol, (3) ethanol, (4) acetone and (6) ethyl acetate. Similar spots with similar retention factors ( $R_f$ ), *i.e.* migrated at the same level compared to the solvent front and had the same coloration after the revelation with *p*-anisaldehyde. For instance, these similitudes between spots at  $R_f$  values of  $\sim 0.04$ ,  $0.10$ ,  $0.19$ ,  $0.29$ ,  $0.38$  and  $0.52$  were apparent. In addition, these extracts had several spots at the bottom of the silica sheet at the same  $R_f$  as polyphenol and sugar standards *i.e.* under  $R_f$  value of  $\sim 0.83$ . Conversely, the methylene chloride (5) and hexane (8) extracts displayed spots at the same level as betulin and piperine standards *i.e.* between  $R_f$  values of  $\sim 0.91$  and  $0.98$ , with few spots at the bottom of the plate. The methylene chloride (5), chloroform (7), hexane (8) and acid-base (10) extracts had similar profiles with trail rather than well-defined spots. The water-ethanol (9) extract contained few compounds with a larger spot present at the bottom the silica sheet ( $R_f = 0$ ). Also, all extracts showed similar phenolic compounds profile except for the extracts with hexane (8) and water-ethanol (9) (Fig. 2C), which contained low amount of phenolic compounds. For instance, the apparent spots in the other extracts had the same  $R_f$  :  $\sim 0.12$ ,  $0.28$  and  $0.56$ . Finally, the use of the Dragendorff reagent did not reveal spot in extracts, but revealed the alkaloid piperine standard confirming the effectiveness of this revelation method.

#### *Antimicrobial assays*

The antimicrobial activity of quaking aspen bark extracts was tested *in vitro* using the broth microdilution method to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) and the minimal bactericidal/fungal concentration (MBC/MFC). The results presented in Table 1 show the antimicrobial activity of different extracts against eight pathogenic

bacteria and fungi species. The MIC and MBC/MFC obtained using the water extract revealed the highest efficiency against all microorganisms compared to other extracts (Table 1). The water extract was efficient against tested microorganisms with a MIC of 0.83 mg/ml for *S. enterica*, *P. aeruginosa* and *A. niger*, a MIC of 1.67 mg/ml for *E. coli*, *E. faecalis* and *S. aureus* as well as a MIC of 2.22 mg/ml for *S. cerevisiae*. A bactericidal effect against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *S. cerevisiae* had also been observed according to the MBC/MFC values of 1.67, 4.44 and 4.44 mg/ml, respectively (Table 1). The methanol extract also showed an interesting antimicrobial activity with MIC values of 4.44, 1.67 and 2.22 mg/ml against *S. aureus*, *A. niger* and *S. cerevisiae* respectively and had a bactericidal activity against *S. cerevisiae* with a MFC value of 4.44 mg/ml (Table 1). The acid-base extract reduced the proliferation of *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. niger* and *C. albicans* with MIC value of 4.44, 2.22, 2.22 and 4.44 mg/ml, respectively (Table 1). However, no bactericidal properties were observed with this acid-base extract. Finally, all of the other extracts tested did not demonstrated considerable antimicrobial activity (Table 1).

#### *UPLC-QTOF-MS characterization*

In order to identify compounds present in most effective antimicrobial extracts (namely those extracted with water and methanol), UPLC-QTOF-MS analyses using positive and negative ionization mode were performed. The masses obtained (showed in Table 2 and 3) were compared with exact masses from different libraries using the MZMine 2.0 software to identify potential compounds. A summary of the identified compounds following UPLC-QTOF-MS analysis is presented in Table 2 and Table 3 for the methanol and water extracts, respectively. The exhaustive list for each of the masses obtained are shown in supplementary Table 1, 2, 3 and 4. The percentage area in table 2 and 3 was calculated according to data presented in supplementary results. In total, 92 different molecules were identified with good confidence, specifically 39 and 53 molecules in methanol and water extract respectively. Molecules were grouped by classes, and other compounds of interest not belonging to the selected families were classified in "others". In both extracts, polyphenols were most abundant and diversified, followed by glycosylated compounds and phenolic acids. Few terpenoids, alkaloids and sugars were

also identified but these classes were less abundant and diversified. According to the number of compounds identified in table 2 and 3, water was a better solvent to extract a wide variety of compounds compared to methanol.

In each class, compounds were classified according to their percentage area. This value represent the area under the peak of the ionized mass ( $M \pm H$ ) at a specific retention time. It depends largely on the ionization efficiency of the molecule. Thus, at similar concentration, an easily ionized molecule will appear more abundant then a less ionizable one. However, since similar class of compounds possess similar chemical feature and ionization potential, we can infer relative abundance based on % area. By example, the polyphenols uvarinol and acacetin in the methanol extract were relatively more abundant compared to other polyphenols with a % area > 4%. Considering both extracts, two compounds in particular appeared more abundant: oleamide and 4-prenylresveratrol in water extract with % area of 9.61 and 7.26 respectively (Table 3).

Following a literature searches on compounds present in both samples, it was possible to target several ones known for their antimicrobial effect. These were grouped and summarized in Table 4. According to UPLC-QTOF-MS results (Table 2 and 3), all molecules in Table 4 represent 19% and 25.87% of the total % area of the methanol and water extracts, respectively. The grouping of these molecules revealed that the majority of compounds reported for their antimicrobial activity in quaking aspen extracts are polyphenols (eight among the twenty-two identified). In general, the majority of compounds of interest are specific to one extraction solvent, water or methanol, but some were present in both including catechol, caffeic acid and 4-hydroxybenzaldehyde. Among compounds of interest in the methanol extract, 4-hydroxybenzaldehyde (5.44%), phloridzin (4.76%), and hydroxyanthraquinone (4.05 %) were more abundant compared to other compounds based on the % area values (Table 2). For the water extract, kaempferol (5.03%) and its glycosylated form, kaempferol 3-O-rutinoside (3.15%), were the most abundant compounds (% area values, Table 3). There was more different compounds recognized for their antimicrobial property in water extract than in methanol extract. Also, nine among the twenty-three molecules targeted were flavonoids (Figure 3),

a subgroup of phenolic compounds. In fact, the molecules, illustrated in Fig 3, have a similar core structure: (2) nobiletin, (3) kaempferol 3-O-rutinoside, (4) apigenin, (5) fisetin, (6) biochanin A, (7) kaempferol, (8) hesperidin, (9) phloridzin and (10) sophoraflavanone G. The basic structure of flavonoids corresponds to fifteen carbon atoms forming two benzene rings and one bridge formed by three carbons that connect the rings together. This bridge generally forms a pyrone ring as illustrated in Fig 3 (1).

## Discussion

### *Composition and extraction yield evaluation*

The aim of this study was to recover, test and identify specialized metabolites from quaking aspen barks in order to obtain antimicrobial extracts. As the final objective is to use raw bark residues from sawmills to produce natural antimicrobial at an industrial scale, it is relevant to characterize this material to further reach an optimal extraction yield. The results obtained from the extraction of each particle size and the ash content revealed that sieving was relevant for eliminating the fractions with low mass in extractives (Fig. 1A and 1C). In fact, several studies reported that finest particles often contain soil contaminants, such as sand and fine sediments, that yield no extractive organic compounds. This explain the highest ash content observed from fraction < 3 mm, which represent the inorganic compound proportion in the bark (Fig. 1A). Inorganic material contains minerals such as potassium, calcium and sodium [27, 28] and these compounds can be harmful to machinery during extraction processes in addition to being undesirable because it does not provide extractive material [25, 26]. Thus, better yields of extractive were obtained with bark of particule sizes greater than 3 mm.

Chemical composition tests carried out according to the NREL protocols allowed to evaluate the composition of the bark material beside the extractives. Results of the average chemical composition of several tree species of the Quebec territory reported by Browne *et al.* (2009) showed that the bark contained between 16 to 40% cellulose, 38 to 58% hemicellulose, 40 to 50% lignin and 2 to 25% extractive compounds. Results obtained for bark of quaking aspen in the present study were below the average proportions of

hemicellulose and lignin with 13% and 25%, respectively (Fig. 1B). Conversely, the residues were composed of 17% extractive materials and this proportion was relatively high compared to the average of tree species in Quebec [5]. In addition, the bark residues had a proportion of cellulose (23%) in the average content of common tree (16-40%). These results demonstrated the relevance to exploit extractive materials from quaking aspen for biorefinery because their abundance is high relative to others tree species from Quebec and also relative to the lignocellulosic compounds of this species.

The extraction with solvents of different dielectric constants, which influences their polarity, yielded to extract the majority of extractive molecules present in the quaking aspen sawmill residues. Since the extraction yield was significantly higher with polar solvents (Fig. 1D), it suggests that abundant specialized metabolites were highly polar compounds, including phenolic compounds, sugars and other glycosylated compounds.

This hypothesis correlated with the chemical profile obtained following the TLC analysis. The three revelation methods (UV,  $\text{FeCl}_3$  and *p*-anisaldehyde) allowed to determine that a large number of compounds were highly polar by the presence of many spots with a low  $R_f$  (Fig. 2). The  $\text{FeCl}_3$  revelation demonstrated that quaking aspen extracts contain many phenolic compounds (Fig. 2C). Finally, revelation with *p*-anisaldehyde reagent suggest that extracts have compounds similar to sugars by the presence of spots with the same color and migration as glucose standard, *i.e.* green and with a  $R_f$  value around 0 (Fig. 2B). Furthermore, according to Prado and Meireles (2010), green spots with low  $R_f$  could be associated to flavonoids compounds.

#### *Antimicrobial activity*

MIC and MBC/MFC results showed that three extracts (water, methanol and acid-base) had antimicrobial properties (Table 1). The water extract followed by the methanol extract yielded a higher efficacy against pathogens. More specifically, water extract displayed an inhibitory effect on all eight pathogens tested. The larger broad-spectrum antimicrobial activity of this extract could be explained by the diversity of metabolites it

contains, as demonstrated with the UPLC-QTOF-MS analysis. Broad-spectrum antimicrobial activity of different plant extracts have been also observed in recent studies [125-127]. The results is also consistent with those obtained by Vardar-Ünlü *et al.* (2008) who have tested, on many different pathogens, the bacteriostatic and bactericidal effect of quaking aspen buds extract obtain with a methanol extraction. Quaking aspen extracts have no bacteriostatic effect against Gram-negative bacteria in both studies (*E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. enterica*), although Vardar-Ünlü *et al.* (2008) observed an antimicrobial effect on *E. faecalis* and *C. albicans* while no antimicrobial effect was observed on these pathogens in our study. These differences can be explained by the use of different tree parts that can contain different metabolites at different concentrations. The difference in efficacy on *C. albicans* can also be explained by the difference of the yeast strain used.

#### *Chemical characterization*

The UPLC-QTOF-MS analyses enabled the potential identification of the compounds present in water and methanol extracts. These results (Table 2 and 3) coupled with TLC revealed with the  $\text{FeCl}_3$  reagent (Fig. 2C) showed that the water and methanol extraction allowed to recover an important variety of phenolic compounds. Interestingly, several studies reviewed the importance of polyphenols and phenolic acids in extract responsible for antimicrobial activity [39, 128-130]. These results substantiated the antimicrobial activity obtained in our study with the families of compounds presents in water and methanol extracts.

It was possible to observe through the UPLC-QTOF-MS analyses (Table 2 and 3) a wide variety of glycosylated compounds. In this case, these glycosylated compounds were, for the vast majority, phenolic compounds bound to a carbohydrate. Depending on the carbohydrate to which it is bound, some of these compounds had different antimicrobial efficiency. For example, kaempferol, present in methanol extract (table 2), were recognized for their antimicrobial activity but kaempferol-hexoside did not seem to have a bioactivity against four pathogens (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* and

*C. albicans*) according to a study from Fattouch *et al.* (2007) [131]. On the contrary, kaempferol-3-O-rutinoside is a glycosylated compound which appeared to have antimicrobial efficacy on the same four pathogens in previous studies from Panizzi *et al.* (2002) and Nenaah (2013) [132, 133]. These molecules are interesting because their carbohydrate structure serves as a recognition site for cellular specific targets and increase, generally, their bioactivity [134, 135]. Also, these compounds may be of interest *in vivo* in the presence of enteric enzymes, which have the ability to hydrolyze these structures and remove the glycosylic bond [136, 137].

Some terpenoids and alkaloids were also identified in water and methanol extract but these compounds are not as diverse as the compound classes mentioned before. However, these are interesting because some compounds of these families are known to have antimicrobial activity, even at low concentration [114, 115, 138]. In fact, only four alkaloid compounds were identified in both extracts and these were not very abundant according to the % area observed (Table 2 and 3). Firstly, these results corroborate with the poor extraction yield obtained with the acid-base method used to concentrate alkaloids (Fig. 1D). These results corroborate also those obtained for TLC analysis that showed a low abundance in alkaloid molecules. The characterization of sugars is relevant since they are undesirable compounds for the purpose of this study. Indeed, the carbohydrates can be used as a substrate by the microorganisms and serve as a source of energy for their proliferation. Knowing their retention time (~ 1.00 min), it would be possible to remove them from the extracts by fractionation and purification methods and induce a carbohydrate starvation to the microorganisms [139].

UPLC-QTOF-MS analyses allowed for the identification of molecules associated to an antimicrobial activity according to previous studies (see Ref. in Table 4). It has been suggested that these molecules are responsible of the bacteriostatic and bactericidal effect of quaking aspen extracts. In accordance to the UPLC-QTOF-MS results, molecules showed in table 4 were particularly abundant in the extract. In fact, these represent 19.00% and 25.87% of the total % area for methanol and water extract respectively. The higher efficiency of the water extract can be explain by the higher abundance and diversity of



antimicrobial compounds in this extract. Based on these results, it was expected to find an inhibitory effect against pathogens for both extracts given the abundance of potentially antimicrobial compounds they contain. Antimicrobial properties could be related to specific molecules in table 4, *i.e.* 4-hydroxybenzaldehyde in methanol extract and kaempferol in water extract because they seem to be highly abundant in extracts according to % area results in table 2 and 3.

The grouping of compounds recognized for their antimicrobial effectiveness allowed to establish a potential relationship between their chemical structure and their activity. These revealed that several molecules among all those present are in the flavonoids class (Fig. 3). Thereby, it seems have a close relation between antimicrobial activity and the flavonoids structure. This relation corroborates previous findings by Cushnie and Lamb (2005), Rauha *et al.* (2000) as well as Sohn *et al.* (2004) and support the idea of an important antimicrobial efficiency of these molecules [138, 140, 141].

It remains difficult to attribute the antimicrobial activity to a specific compound in such a complex compound mixture. Synergistic and antagonistic effects may be present which make analyzes sophisticated [32, 38]. Also, the study of antimicrobial metabolites from natural plant sources remain laborious due to the variability of the compound concentration between extract from different lots of raw materials. In fact, metabolite profile can change according to the quaking aspen species collected, harvest location and/or harvest period, etc. [142, 143]. Finally, some compounds remains unidentified due to the detection limit of the UPLC-QTOF-MS apparatus and due to the library used and the limit of available information. Consequently, it is possible that some compounds may have been discarded while they have high activity.

## Conclusion

The aim of this study was to determine the antimicrobial potential of quaking aspen bark residues through the extraction of bioactive metabolites. We found that specialized metabolite extractions are relevant to isolate antimicrobial molecules from bark residues.

The extraction yield results as well as MIC and MBC/MFC results has identified two promising solvents: water and methanol. The physicochemical analysis of these two extracts identified hundreds of metabolites of interest, among which some had an antimicrobial effect in accordance to previous studies. Analysis of the chemical structure of these compounds revealed possible correlations between flavonoid structure and antimicrobial effect.

Overall, our study supports the relevance of being interested on quaking aspen bark residues to valorize its biomass through these bioactive metabolites. Until this day, this species was undervalued because no previous exhaustive study had linked the chemical composition of its bark to its antimicrobial activity. Now, this study allowed to confirm the antimicrobial efficacy by the presence of antimicrobial compounds in the quaking aspen. This specie is also interesting because optimal extraction conditions are consistent with antimicrobial efficacy results. Water, which is the most efficient solvent, is the solvent suitable for extraction since it is non-polluting, inexpensive and the most accessible.

### **Acknowledgments**

The authors wish to thank the industrial collaborators and financial institution for their financial support in this project, including Forêt Modele du Lac-St-Jean (FMLSJ), Sani Marc Group, the Coopérative pour la valorisation de la biomasse (CVB), the Consortium de recherche et d'innovation en bioprocédés industriels au Québec (CRIBIQ) and the Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG).

Professor Simon Barnabé and Patrick Marchand are acknowledged for their chemicals and microbiology equipment provided. Authors wish to thank Stéphanie B. Blais and Josée Doucet for their technical support. Dominic Desrosiers is acknowledged for his scientific support. Finally, they wish to thank Pascal Dubé for the UPLC-QTOF-MS analysis.

## References

- Abuelsaad, A. S., Mohamed, I., Allam, G., Al-Solumani, A. A., 2013. Antimicrobial and immunomodulating activities of hesperidin and ellagic acid against diarrheic *Aeromonas hydrophila* in a murine model. *Life sciences* 93, 714-722.
- Anja Klančnik, S. P., Barbara Jeršek, Sonja Smole Možina, 2010. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods* 81, 121-126.
- Baldisserotto, A., Malisardi, G., Scalambra, E., Andreotti, E., Romagnoli, C., Vicentini, C. B., Manfredini, S., Vertuani, S., 2012. Synthesis, antioxidant and antimicrobial activity of a new phloridzin derivative for dermo-cosmetic applications. *Molecules* 17, 13275-13289.
- Barreca, D., Bellocco, E., Laganà, G., Ginestra, G., Bisignano, C., 2014. Biochemical and antimicrobial activity of phloretin and its glycosilated derivatives present in apple and kumquat. *Food Chemistry* 160, 292-297.
- Basile, A., Giordano, S., López-Sáez, J. A., Cobianchi, R. C., 1999. Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochemistry* 52, 1479-1482.
- Basile, A., Sorbo, S., Giordano, S., Ricciardi, L., Ferrara, S., Montesano, D., Cobianchi, R. C., Vuotto, M., Ferrara, L., 2000. Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. *Fitoterapia* 71, S110-S116.
- Bisignano, G., Sanogo, R., Marino, A., Aquino, R., 'angelo, V. D., German, ograve, M. P., De Pasquale, R., Pizza, C., 2000. Antimicrobial activity of *Mitracarpus scaber* extract and isolated constituents. *Letters in Applied Microbiology* 30, 105-108.
- Boik, J., Kirakosyan, A., Kaufman, P. B., Seymour, E. M., Spelman, K., 2009. Interactions of Bioactive Plant Metabolites: Synergism, Antagonism, and Additivity. *Recent Advances in Plant Biotechnology*. Springer US, Boston, MA, pp. 213-230.
- Bouchard, M., 2013. Identification d'utilisations pour le bouleau à papier et le peuplier faux-tremble. *Enseignement supérieur, Recherche, science et technologie, Québec*.
- Bridgeman, T. G., Darvell, L. I., Jones, J. M., Williams, P. T., Fahmi, R., Bridgwater, A. V., Barraclough, T., Shield, I., Yates, N., Thain, S. C., Donnison, I. S., 2007. Influence of particle size on the analytical and chemical properties of two energy crops. *Fuel* 86, 60-72.

- Browne, T., Paice, M., Jemaa, N., Paleologou, M., Zhang, X., Champoux, M., 2009. Le bioraffinage forestier : Possibilité pour les entreprises québécoises de pâtes et papiers In: Ministère des Ressources naturelles et de la Faune. (Ed.). Gouvernement du Québec, Québec (Québec), p. 40.
- Celhay, C., Mathieu, C. E., Candy, L., Vilarem, G., Rigal, L., 2014. Aqueous extraction of polyphenols and antiradicals from wood by-products by a twin-screw extractor: Feasibility study. *Comptes Rendus Chimie* 17, 204-211.
- Čerňáková, M., Košťálová, D., 2002. Antimicrobial activity of berberine—a constituent of *Mahonia aquifolium*. *Folia Microbiologica* 47, 375-378.
- Cha, J.-D., Jeong, M.-R., Jeong, S.-I., Lee, K.-Y., 2007. Antibacterial activity of sophoraflavanone G isolated from the roots of *Sophora flavescens*. *Journal of microbiology and biotechnology* 17, 858-864.
- Chang, S.-T., Chen, P.-F., Chang, S.-C., 2001. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Ethnopharmacology* 77, 123-127.
- Chi, Y. S., Jong, H. G., Son, K. H., Chang, H. W., Kang, S. S., Kim, H. P., 2001. Effects of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: cyclooxygenases and lipoxygenases. *Biochemical pharmacology* 62, 1185-1191.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing filamentous fungi, approved standard. CLSI document M38-A2, 950 West Valley Road, suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, approved standard. CLSI document M07-A9, 950 West Valley Road, suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA.
- Cohen, M. L., 1992. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science(Washington)* 257, 1050-1055.
- Cone, E. J., Presley, L., Lehrer, M., Seiter, W., Smith, M., Kardos, K. W., Fritch, D., Salamone, S., Niedbala, R. S., 2002. Oral fluid testing for drugs of abuse : Positive prevalence rates by Intercept immunoassay screening and GC-MS-MS confirmation and suggested cutoff concentrations *Journal of Analytical Toxicology* 25, 130-136.

- Cueva, C., Moreno-Arribas, M. V., Martín-Álvarez, P. J., Bills, G., Vicente, M. F., Basilio, A., Rivas, C. L., Requena, T., Rodríguez, J. M., Bartolomé, B., 2010. Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Research in Microbiology* 161, 372-382.
- Cushnie, T. P. T., Cushnie, B., Lamb, A. J., 2014. Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *International Journal of Antimicrobial Agents* 44, 377-386.
- Cushnie, T. T., Lamb, A. J., 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents* 26, 343-356.
- da Costa, M. P., Bozinis, M. C. V., Andrade, W. M., Costa, C. R., da Silva, A. L., Alves de Oliveira, C. M., Kato, L., Fernandes, O. d. F. L., Souza, L. K. H., Silva, M. d. R. R., 2014. Antifungal and cytotoxicity activities of the fresh xylem sap of *Hymenaea courbaril* L. and its major constituent fisetin. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 14, 245.
- Demirbas, A., Demirbas, M. F., 2010. Biorefineries. *Algae Energy*. Springer, pp. 159-181.
- Diouf, P. N., Stevanovic, T., Cloutier, A., 2009. Antioxidant properties and polyphenol contents of trembling aspen bark extracts. *Wood science and technology* 43, 457-470.
- Duraipandiyan, V., Indwar, F., Ignacimuthu, S., 2010. Antimicrobial activity of confertifolin from *Polygonum hydropiper*. *Pharmaceutical biology* 48, 187-190.
- Eswaranandam, S., Hettiarachchy, N., Johnson, M., 2004. Antimicrobial activity of citric, lactic, malic, or tartaric acids and nisin- incorporated soy protein film against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7, and *Salmonella gaminara*. *Journal of Food Science* 69.
- Fattouch, S., Caboni, P., Coroneo, V., Tuberoso, C. I., Angioni, A., Dessi, S., Marzouki, N., Cabras, P., 2007. Antimicrobial activity of Tunisian quince (*Cydonia oblonga* Miller) pulp and peel polyphenolic extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 963-969.
- Friedman, M., Henika, P. R., Mandrell, R. E., 2003. Antibacterial activities of phenolic benzaldehydes and benzoic acids against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of food protection* 66, 1811-1821.

- Fu, X., Albermann, C., Jiang, J., Liao, J., Zhang, C., Thorson, J. S., 2003. Antibiotic optimization via in vitro glycorandomization. *Nature biotechnology* 21, 1467-1469.
- Gachon, C. M. M., Langlois-Meurinne, M., Saindrenan, P., 2005. Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. *Trends in Plant Science* 10, 542-549.
- Gadang, V., Hettiarachchy, N., Johnson, M., Owens, C., 2008. Evaluation of antibacterial activity of whey protein isolate coating incorporated with nisin, grape seed extract, malic acid, and EDTA on a turkey frankfurter system. *Journal of Food Science* 73.
- Gold, H. S., Moellering Jr, R. C., 1996. Antimicrobial-drug resistance. *New England Journal of Medicine* 335, 1445-1453.
- Gurib-Fakim, A., 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* 27, 1-93.
- He, M., Wu, T., Pan, S., Xu, X., 2014. Antimicrobial mechanism of flavonoids against *Escherichia coli* ATCC 25922 by model membrane study. *Applied Surface Science* 305, 515-521.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D. J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 572-584.
- Heleno, S. A., Ferreira, I. C., Esteves, A. P., Ćirić, A., Glamočlija, J., Martins, A., Soković, M., Queiroz, M. J. R., 2013. Antimicrobial and demelanizing activity of *Ganoderma lucidum* extract, p-hydroxybenzoic and cinnamic acids and their synthetic acetylated glucuronide methyl esters. *Food and chemical toxicology* 58, 95-100.
- Herald, P. J., Davidson, P. M., 1983. Antibacterial Activity of Selected Hydroxycinnamic Acids. *Journal of Food Science* 48, 1378-1379.
- Huq, A., Jamal, J. A., Stanslas, J., 2014. Ethnobotanical, phytochemical, pharmacological, and toxicological aspects of *Persicaria hydropiper* (L.) delarbre. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014.
- Hwang, J. H., Choi, H., Hwang, I.-s., Kim, A. R., Woo, E.-R., Lee, D. G., 2013. Synergistic Antibacterial and Antibiofilm Effect Between (+)-Medioresinol and Antibiotics In Vitro. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 170, 1934-1941.



- Hwang, J. H., Hwang, I.-s., Liu, Q.-H., Woo, E.-R., Lee, D. G., 2012. (+)-Medioresinol leads to intracellular ROS accumulation and mitochondria-mediated apoptotic cell death in *Candida albicans*. *Biochimie* 94, 1784-1793.
- Inouye, S., Takizawa, T., Yamaguchi, H., 2001. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 47, 565-573.
- Janowiak, M. K., Webster, C. R., 2010. Promoting ecological sustainability in woody biomass harvesting. *Journal of forestry* 108, 16-23.
- Jeong, E.-Y., Jeon, J.-H., Lee, C.-H., Lee, H.-S., 2009. Antimicrobial activity of catechol isolated from *Diospyros kaki* Thunb. roots and its derivatives toward intestinal bacteria. *Food chemistry* 115, 1006-1010.
- Jia, Z., Tian, C., 2009. Quantitative determination of polyethylene glycol with modified Dragendorff reagent method. *Desalination* 247, 423-429.
- Kocaçalışkan, I., Talan, I., Terzi, I., 2006. Antimicrobial activity of catechol and pyrogallol as allelochemicals. *Zeitschrift für Naturforschung C* 61, 639-642.
- Koppejan, J., Van Loo, S., 2012. *The handbook of biomass combustion and co-firing*. Routledge.
- Kuete, V., Nguemeving, J. R., Beng, V. P., Azebaze, A. G. B., Etoa, F.-X., Meyer, M., Bodo, B., Nkengfack, A. E., 2007. Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Vismia laurentii* De Wild (Guttiferae). *Journal of Ethnopharmacology* 109, 372-379.
- Kukić, J., Popović, V., Petrović, S., Mucaji, P., Ćirić, A., Stojković, D., Soković, M., 2008. Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. *Food Chemistry* 107, 861-868.
- Lattanzio, V., 2013. *Phenolic Compounds: Introduction*.
- Lee, O.-H., Lee, B.-Y., 2010. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource technology* 101, 3751-3754.
- Lindroth, R., Osier, T., Barnhill, H., Wood, S., 2002. Effects of genotype and nutrient availability on phytochemistry of trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.) during leaf senescence. *Biochemical Systematics and Ecology* 30, 297-307.

- Liu, G., Liang, J.-C., Wang, X.-L., Li, Z.-H., Wang, W., Guo, N., Wu, X.-P., Shen, F.-G., Xing, M.-X., Liu, L.-H., 2011. In vitro synergy of biochanin A and ciprofloxacin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *molecules* 16, 6656-6666.
- Liu, X., Bi, X. T., 2011. Removal of inorganic constituents from pine barks and switchgrass. *Fuel Processing Technology* 92, 1273-1279.
- Lou, Z., Wang, H., Rao, S., Sun, J., Ma, C., Li, J., 2012. p-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. *Food Control* 25, 550-554.
- Lu, J.-J., Bao, J.-L., Chen, X.-P., Huang, M., Wang, Y.-T., 2012. Alkaloids Isolated from Natural Herbs as the Anticancer Agents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012, 12.
- M.P. Fernandez, P.A. Watson, Breuil, C., 2001. Gas chromatography–mass spectrometry method for the simultaneous determination of wood extractive compounds in quaking aspen. *Journal of Chromatography A* 922, 225-233.
- Méndez, C., Salas, J. A., 2001. Altering the glycosylation pattern of bioactive compounds. *Trends in Biotechnology* 19, 449-456.
- Merkl, R., HRádkoVá, I., FIIIp, V., ŠMIIdRkal, J., 2010. Antimicrobial and antioxidant properties of phenolic acids alkyl esters. *Czech J Food Sci* 28, 275-279.
- Miranda, I., Gominho, J., Mirra, I., Pereira, H., 2013. Fractioning and chemical characterization of barks of *Betula pendula* and *Eucalyptus globulus*. *Industrial Crops and Products* 41, 299-305.
- Nadeem Khan, Arshad Mehmood Abbasi, Ghulam Dastagir, Abdul Nazir, Ghulam Mujtaba Shah, Shah, M. M. S. a. M. H., 2014. Ethnobotanical and antimicrobial study of some selected medicinal plants used in Khyber Pakhtunkhwa (KPK) as a potential source to cure infectious diseases. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 14, 1-10.
- National Renewable Energy Laboratory, 2017. Biomass Compositional Analysis Laboratory Procedures. United States.
- Nenaah, G., 2013. Antimicrobial activity of *Calotropis procera* Ait. (Asclepiadaceae) and isolation of four flavonoid glycosides as the active constituents. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29, 1255-1262.



- Ojala, T., Remes, S., Haansuu, P., Vuorela, H., Hiltunen, R., Haahtela, K., Vuorela, P., 2000. Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. *Journal of ethnopharmacology* 73, 299-305.
- Osier, T. L., Hwang, S.-Y., Lindroth, R. L., 2000. Within- and between-year variation in early season phytochemistry of quaking aspen (*Populus tremuloides* Michx.) clones. *Biochemical Systematics and Ecology* 28, 197-208.
- Pal, D., Singh, H., Kumar, M., 2012. A preliminary study on the in vitro antioxidant activity of seeds of *Aesculus indica* and barks of *Populus euphratica*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 4, 249-250.
- Pandey, K. B., Rizvi, S. I., 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2, 270-278.
- Panizzi, L., Caponi, C., Catalano, S., Cioni, P. L., Morelli, I., 2002. In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. *Journal of Ethnopharmacology* 79, 165-168.
- Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A., Orešič, M., 2010. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* 11, 395.
- Proestos, C., Boziaris, I., Nychas, G.-J., Komaitis, M., 2006. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry* 95, 664-671.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., Oksman-Caldentey, K. M., 2001. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of applied microbiology* 90, 494-507.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouységu, L., 2011. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition* 50, 586-621.
- Rates, S. M. K., 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon* 39, 603-613.
- Rauha, J.-P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H., Vuorela, P., 2000. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International journal of food microbiology* 56, 3-12.

- Raybaudi-Massilia, R. M., Mosqueda-Melgar, J., Martín-Belloso, O., 2009. Antimicrobial activity of malic acid against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis* and *Escherichia coli* O157: H7 in apple, pear and melon juices. *Food Control* 20, 105-112.
- Royer, M., Houde, R., Viano, Y., Stevanovic, T., 2012. Non-wood Forest Products Based on Extractives-A New Opportunity for the Canadian Forest Industry Part 1: Hardwood Forest Species. *Journal of Food Research* 1, 8.
- Saavedra, M. J., Borges, A., Dias, C., Aires, A., Bennett, R. N., Rosa, E. S., Simões, M., 2010. Antimicrobial activity of phenolics and glucosinolate hydrolysis products and their synergy with streptomycin against pathogenic bacteria. *Medicinal Chemistry* 6, 174-183.
- Saxena, G., McCutcheon, A. R., Farmer, S., Towers, G. H. N., Hancock, R. E. W., 1994. Antimicrobial constituents of *Rhus glabra*. *Journal of Ethnopharmacology* 42, 95-99.
- Si, W., Gong, J., Tsao, R., Zhou, T., Yu, H., Poppe, C., Johnson, R., Du, Z., 2006. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 100, 296-305.
- SiliCycle Inc., 2017. SiliaPlate™- TLC Visualization Methods. vol. 2017, Quebec City (Quebec).
- Smyth, T., Ramachandran, V. N., Smyth, W. F., 2009. A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. *International Journal of Antimicrobial Agents* 33, 421-426.
- Sohn, H. Y., Son, K. H., Kwon, C. S., Kwon, G. S., Kang, S. S., 2004. Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai. *Phytomedicine* 11, 666-672.
- Stermitz, F. R., Lorenz, P., Tawara, J. N., Zenewicz, L. A., Lewis, K., 2000. Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 1433-1437.
- Stojković, D., Petrović, J., Soković, M., Glamočlija, J., Kukić-Marković, J., Petrović, S., 2013. In situ antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic

- acid, p-coumaric acid and rutin, using food systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93, 3205-3208.
- Taguri, T., Tanaka, T., Kouno, I., 2006. Antibacterial spectrum of plant polyphenols and extracts depending upon hydroxyphenyl structure. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 29, 2226-2235.
- Tholl, D., 2015. Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants. In: Schrader, J., Bohlmann, J. (Eds.), *Biotechnology of Isoprenoids*. Springer International Publishing, Cham, pp. 63-106.
- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., Mazzanti, G., Bisignano, G., 2005. Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49, 2474-2478.
- Tsuchiya, H., Iinuma, M., 2000. Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*. *Phytomedicine* 7, 161-165.
- Vaquero, M. R., Alberto, M., de Nadra, M. M., 2007. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control* 18, 93-101.
- Vardar-Ünlü, G., Silici, S., Ünlü, M., 2008. Composition and in vitro antimicrobial activity of *Populus* buds and poplar-type propolis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24, 1011-1017.
- Viral V. Mehta, G. R., As hwin Rao, Ramya Shenoy, Mithun Pai B.H., 2014. Antimicrobial Efficacy of *Punica granatum* mesocarp, *Nelumbo nucifera* Leaf, *Psidium guajava* Leaf and *Coffea Canephora* Extract on Common Oral Pathogens: An In-vitro Study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 8, 65-68.
- Wang, J., Zhao, H., Kong, W., Jin, C., Zhao, Y., Qu, Y., Xiao, X., 2010. Microcalorimetric assay on the antimicrobial property of five hydroxyanthraquinone derivatives in rhubarb (*Rheum palmatum* L.) to *Bifidobacterium adolescentis*. *Phytomedicine* 17, 684-689.
- Watson, S. P., Clements, M. O., Foster, S. J., 1998. Characterization of the Starvation-Survival Response of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 180, 1750-1758.
- Wink, M., 2008. Evolutionary Advantage and Molecular Modes of Action of Multi-Component Mixtures Used in Phytomedicine. *Current Drug Metabolism* 9, 996-1009.

- Wink, M., 2010. Introduction: biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites. *Annual Plant Reviews Volume 40: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*, Second Edition, 1-19.
- Yanwen, W., Wenyuan, G., Xiaohe, X., Yi, L., 2005. Calorimetric investigation of the effect of hydroxyanthraquinones in *Rheum officinale* Baill on *Staphylococcus aureus* growth. *Thermochimica Acta* 429, 167-170.
- Yao, X., Zhu, X., Pan, S., Fang, Y., Jiang, F., Phillips, G. O., Xu, X., 2012. Antimicrobial activity of nobiletin and tangeretin against *Pseudomonas*. *Food chemistry* 132, 1883-1890.
- Yi, Z., Yu, Y., Liang, Y., Zeng, B., 2008. In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* of a new Citrus cultivar and its main flavonoids. *LWT-Food Science and Technology* 41, 597-603.

## Figures legends

**Figure 1. Evaluation of Quaking Aspen barks composition and yield according to different extraction parameters.** (A) Ash content (% m/m) of barks according to the granulometric fraction < 3 mm or > 3 mm. (B) Quaking aspen barks relative composition of extractives, ash and lignocellulosic materials (% m/m). (C) Extraction yields of quaking aspen barks at different granulometric conditions and with different extraction solvents. (D) Mass yield (% of total dry mass) of quaking aspen barks according to different extraction solvents ( $n = 3$ ,  $P < 0.05$ ).

**Figure 2. TLC plate demonstrating the phytochemical profile of quaking aspen.** TLC were executed using three revelation methods: A) UV light at 254 nm, B) *p*-anisaldehyde reagent, C) iron chloride ( $\text{FeCl}_3$ ). The different extracts (1-10) represent quaking aspen extracts with different extraction solvents. From left to right: (1) water, (2) methanol, (3) ethanol, (4) acetone, (5) methylene chloride, (6) ethyl acetate, (7) chloroform, (8) hexane, (9) water-ethanol, (10) acid-base extract. (S) corresponds to standard mix of glucose (g), ferrulic acid (f), vanillin (v), betulin (b) and piperine (p) with their respective localisation on TLC.

**Figure 3. Chemical structure of flavonoids content in quaking aspen extract with potential antimicrobial activity.** (1) Basis flavonoid structure, (2) nobiletin, (3) kaempferol 3-O-rutinoside, (4) apigenin, (5) fisetin, (6) biochanin A, (7) Kaempferol, (8) Hesperidin, (9) phloridzin and (10) sophoraflavanone G. These flavonoid compounds were proposed by MZMine 2.0 software following the UPLC-QTOF-MS analysis and specifically selected for their antimicrobial potential according to the literature.

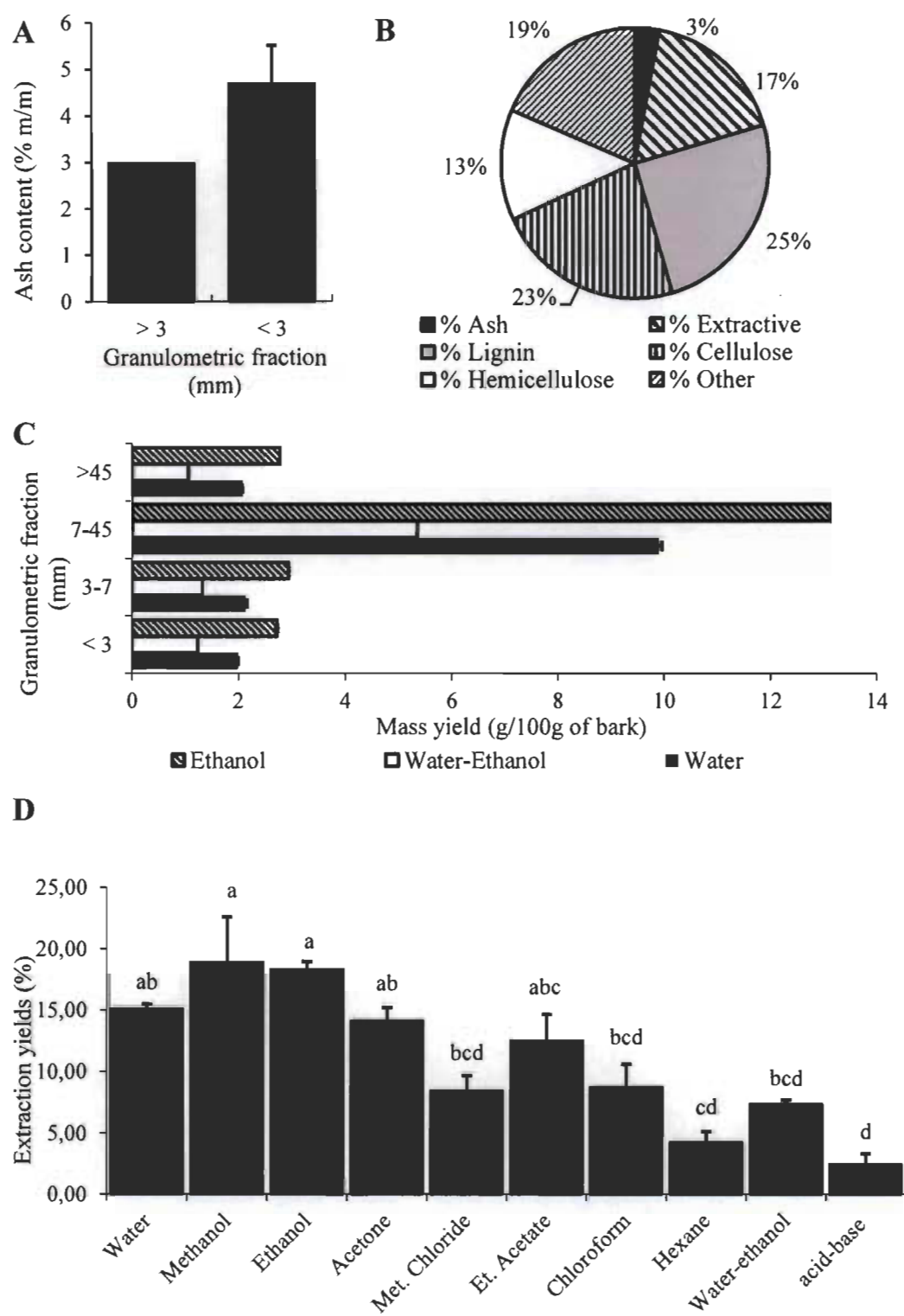
**Figure 1.**

Figure 2.

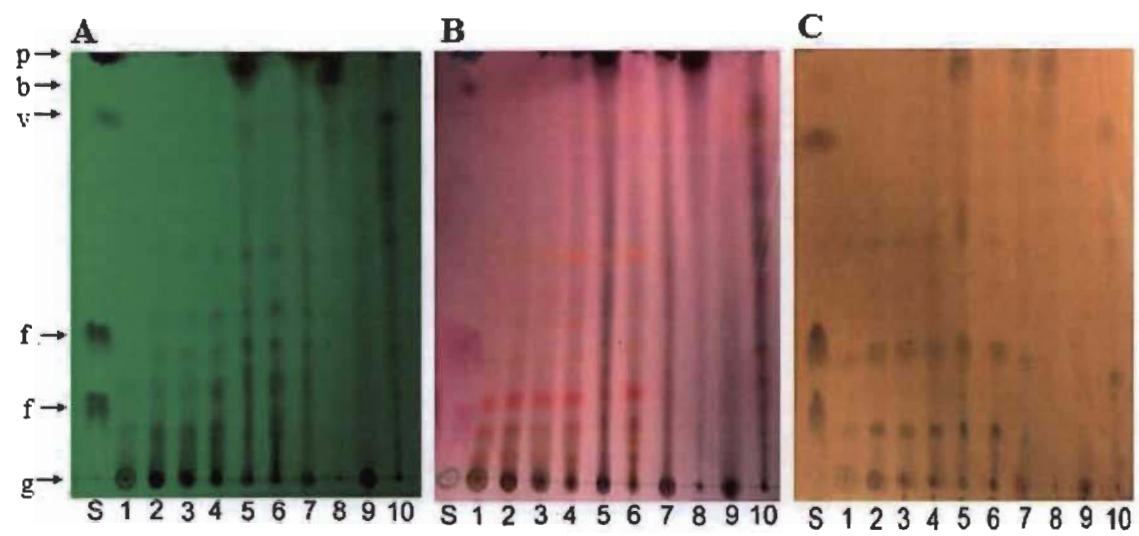
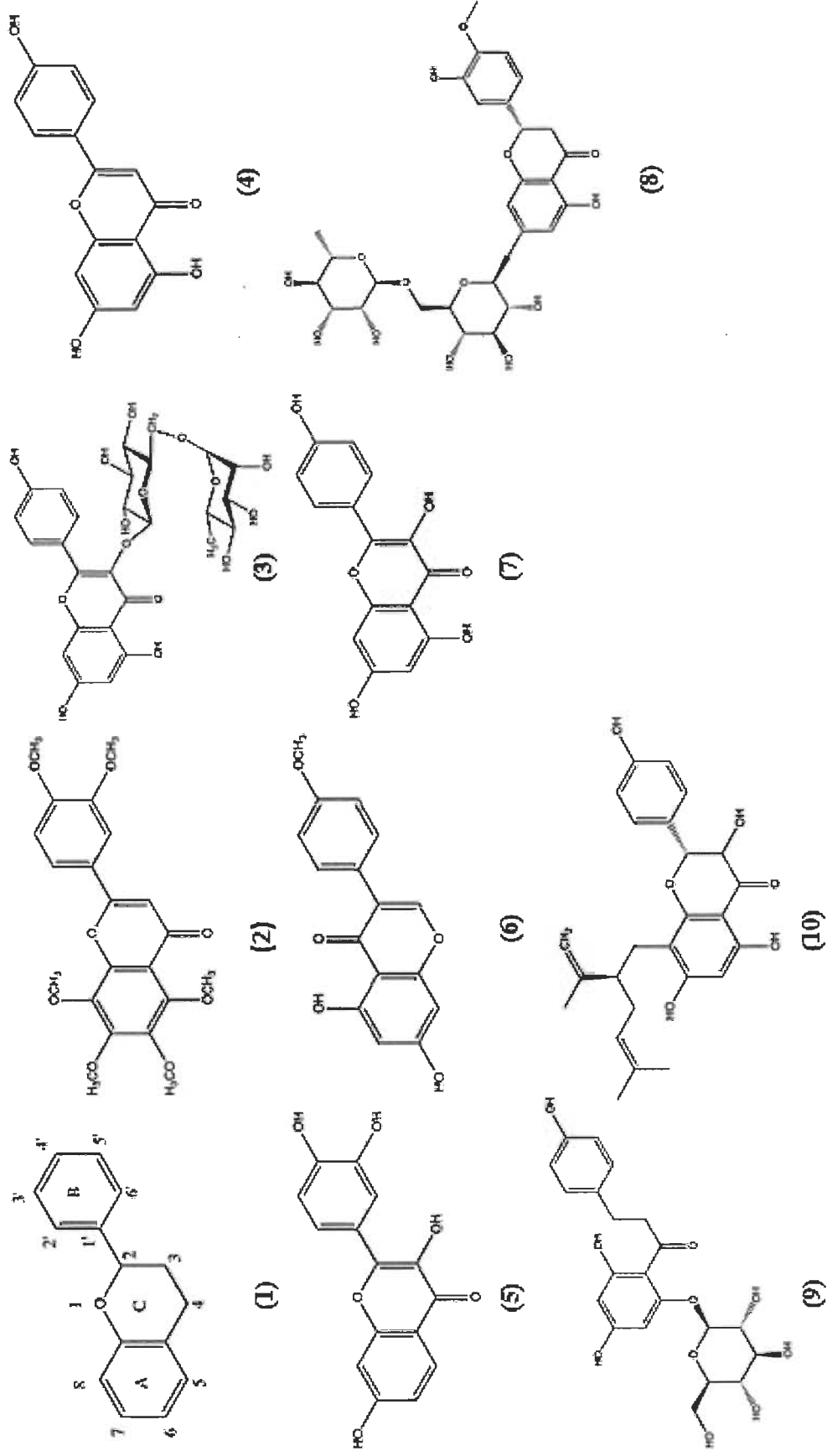


Figure 3.





## Tables

**Table 1.** Antimicrobial activity of quaking aspen bark extracts against different strains of microorganisms using the broth microdilution method.

Extract	<i>E. coli</i>		<i>S. enterica</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>A. niger</i>		<i>C. albicans</i>		<i>S. cerevisiae</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
Water	1.67	— <sup>c</sup>	0.83	—	0.83	4.44	1.67	1.67	1.67	—	0.83	—	1.67	—	2.22	4.44
Methanol	—	—	—	—	—	—	4.44	—	—	—	1.67	—	—	—	2.22	4.44
Ethanol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Acetone	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Methylene chloride	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ethyl acetate	—	—	—	—	4.44	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
chloroform	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Hexane	—	—	1.67	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Water-ethanol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Acid-base	4.44	—	—	—	2.22	—	—	—	—	—	2.22	—	4.44	—	—	—
QAC <sup>d</sup>	2.60 <sup>e</sup>	5.21 <sup>e</sup>	0.651 <sup>e</sup>	0.651 <sup>e</sup>	10.4 <sup>e</sup>	10.4 <sup>e</sup>	5.21 <sup>e</sup>	5.21 <sup>e</sup>	2.60 <sup>e</sup>	2.60 <sup>e</sup>	10.4 <sup>e</sup>	10.4 <sup>e</sup>	5.21 <sup>e</sup>	5.21 <sup>e</sup>	2.60 <sup>e</sup>	2.60 <sup>e</sup>

<sup>a</sup>MIC, minimum inhibitory concentration. Values given as mg. ml<sup>-1</sup> for extracts and as mg. L<sup>-1</sup> for QAC.

<sup>b</sup>MBC, minimum bactericidal concentration/MFC, minimum fungicidal concentration. Values given as mg. ml<sup>-1</sup> for extracts and as mg. L<sup>-1</sup> for QAC.

<sup>c</sup>Not active at maximum concentration (4.44 mg. ml<sup>-1</sup>).

<sup>d</sup>QAC; quaternary ammonium compound as positive control.

<sup>e</sup>Concentration expressed in mg. L<sup>-1</sup>

**Table 2** Summary of the characterization of quaking aspen compounds of interest identified from methanol extract following UPLC-QTOF-MS analysis.

Compound class	Proposed compound <sup>a</sup>	% Area <sup>b</sup>	RT <sup>c</sup> (min)	Exact mass ( <i>m/z</i> )	
				[M+H] <sup>+</sup> <sup>d</sup>	[M-H] <sup>-</sup> <sup>d</sup>
Polyphenols	Uvarinol	4.44	13.01		573.1666
	Acacetin	4.37	15.73		285.0872
	Cyanidin	2.22	7.71	288.0170	
	Chamuvartin	1.80	9.70		451.1318
	Hesperidin	1.76	13.32		301.0840
	Dimethylquercetin	1.57	6.06		329.1043
	Catechol	1.22	5.99		109.0582
	Acetylglycitin	0.95	9.09		487.1998
Phenolic acids	Diferuloyquinic acid	4.19	12.41		543.1303
	Coumaric acid	1.73	7.90		163.0654
	Hydroxybenzoic acid	1.13	9.96		137.0445
	Coumaroylquinic acid	1.05	5.17		337.1691
	Caffeic acid	0.78	1.31		179.0711
Terpenoids	Arbusculin A	1.38	8.15	251.1600	
	Confertifolin	1.36	6.57	235.1504	
	Palustradiene	0.76	8.93	273.2144	
Sugars	Galloyl glucose	4.82	5.29		331.1157
	D-Ribofuranose	1.53	6.11	150.8690	
Glycosylated compounds	Phloridzin	4.76	10.93		435.1344
	Apigenin-glucoside	4.22	10.42		431.1400
	Grandidentatin	3.89	9.94		423.1767
	Coumaric acid glucoside	3.45	6.21		325.0998
	Naringenin-glucoside	1.36	9.34		433.1198
	Luteolin-hexoside	0.81	11.49		447.1463
	Kaempferol-hexoside	0.75	10.72		461.1678
	Kaempferol-hexoside	0.71	9.67		447.1667
Alkaloids	Dihydrozeatin	3.75	10.44	222.1829	
	isoquinoline-1.5-diol	3.14	5.34	161.7838	
	(-)-Hygrolin	1.54	7.15	144.1000	
Others	Butonate	5.47	13.95	326.9853	
	4-Hydroxybenzaldehyde	5.44	9.83	122.8692	
	1,2,4-Trimethylbenzene	4.19	15.79	121.5811	
	Hydroxyanthraquinone	4.05	10.95	225.0530	
	Gluconic acid	2.06	13.98	195.1299	
	Adipic acid	1.65	5.22	146.8463	
	Nobiletin	0.98	1.45		401.1542
	Malic acid	0.97	8.67	133.4128	
	Thiodiacetic acid	0.89	13.69	150.9699	
	1.4-Naphthoquinone	0.83	1.52	159.0468	

<sup>a</sup> Proposed compounds were based on match of exact mass results with base data in MZMine 2.0 library using a UPLC-QTOF-MS method. Some compounds were discarded from the list because they did not abide by the following selection criteria: (1) % area above 0.5%. (2) Compounds whose exact structure was identified by the library (compound with crude formula only was discarded) (3) recognized compounds in literature and mainly for their biological activity. <sup>b</sup> % area was calculated for each ionization mode analysis. <sup>c</sup> RT; Retention time. <sup>d</sup>[M+H]<sup>+</sup>: exact mass from positive ionization mode analysis. [M-H]<sup>-</sup>: exact mass from negative ionization mode analysis.

**Table 3** Summary of the characterization of quaking aspen compounds of interest identified from water extract following UPLC-QTOF-MS analysis..

Compound class	Proposed compound <sup>a</sup>	% Area <sup>b</sup>	RT <sup>c</sup> (min)	Exact mass (m/z)	
				[M+H] <sup>+</sup> d	[M-H] <sup>-</sup> d
Polyphenols	4-prenylresveratrol	7.26	14.40		295.1533
	Kaempferol	5.03	15.60	287.0954	
	Isorhamnetin	4.39	10.63		315.1832
	3-methoxyapigenin	3.49	15.90	301.0837	
	Cirsimaritin	3.13	11.46		313.1609
	Pinobanksin	3.11	12.20	273.0878	
	Epirosmanol	2.58	5.08		345.1393
	Medioresinol	2.19	7.34		387.1865
	Kaempferide	2.12	14.10		299.1870
	Kaempferol	1.98	15.56		285.0911
	Catechol	1.63	5.65		109.0384
	Sophoraflavanone G	1.45	10.13		423.1942
	5-tricosenylresorcinol	1.39	10.25		431.1579
	Kaempferide	1.21	15.93		299.0782
	Fisetin	1.08	12.40	287.0953	
	Apigenin	0.92	13.60	271.1084	
	Biochanin A	0.92	15.70	285.0903	
	Glepidotin	0.68	15.23		297.1750
	Apigenin	0.51	12.20	271.0766	
Phenolic acids	4-hydroxybenzoic acid	2.09	9.15		137.0339
	3-hydroxybenzoic acid	1.77	5.58		137.0339
	Caffeic acid	0.94	1.18		179.0467
	4-hydroxyphenylacetic acid	0.83	4.35		151.0183
	Hydroxycaffeic acid	0.67	1.21		195.0708
	Vanilic acid	0.59	6.37		167.0509
Terpenoids	Trilobolide	1.13	11.51		521.2712
	Phytuberin	0.87	15.31	293.1385	
Sugars	D-Rhamnose	2.64	1.00	165.0511	
	Chitobiose	1.01	9.80	425.1993	
	D-Glucose	0.65	1.00	181.0349	
Glycosylated compounds	Kaempferol 3-O-rutinoside	3.15	11.08		593.2896
	Salicin	2.37	11.40	287.1035	
	Syringin	1.93	11.90	373.1422	
	Myricetin 3-O-arabinoside	1.74	5.58		449.1708
	Arbutin	1.65	12.20		271.0804
	Jaceidin 4'-O-glucuronide	1.47	9.67		535.2496
	Ferulic acid 4-O-glucoside	1.33	9.93		355.1625
	Fisetin 8-C-glucoside	1.19	9.10	449.1325	
	Quercetin-3-O-glucuronide	0.80	9.30		477.2510
	Gallic acid 4-O-glucoside	0.80	14.40		331.1295
	Quercetin-3-O-glucuronide	0.68	10.16		477.2510

**Table 3 (continued).** Summary of the characterization of quaking aspen compounds of interest identified from water extract following UPLC-QTOF-MS analysis.

Compound class	Proposed compound <sup>a</sup>	% Area <sup>b</sup>	RT <sup>c</sup> (min)	Exact mass (m/z)	
				[M+H] <sup>+</sup> <sup>d</sup>	[M-H] <sup>-</sup> <sup>d</sup>
Alkaloids	Berberine	0.50	11.90	337.1196	
Others	Oleamide	9.61	26.60	282.2869	
	Octadecyl	3.38	23.80	254.2584	
	1-Heptadecanamine	2.89	26.00	256.2760	
	4-Hydroxybenzaldehyde	1.47	9.60	123.0455	
	4-Hydroxybenzaldehyde	1.11	6.85		121.0385
	Coumarin	1.03	7.60	147.0472	
	4-nitrophenol	0.96	34.90	139.9936	
	Benzoin	0.89	5.10	213.1013	
	Simazine	0.76	1.00	202.0671	
	Diosgenin	0.75	7.20	415.2760	
	1,4-Naphthoquinone	0.55	3.14		157.0664

<sup>a</sup> Proposed compounds were based on match of exact mass results with base data in MZMine 2.0 library using a UPLC-QTOF-MS method. Some compounds were discarded from the list because they did not abide by the following selection criteria: (1) % area above 0.5%. (2) Compounds whose exact structure was identified by the library (compound with crude formula only was discarded) (3) recognized compounds in literature and mainly for their biological activity. <sup>b</sup> % area was calculated for each ionization mode analysis. <sup>c</sup> RT; Retention time. <sup>d</sup>[M+H]<sup>+</sup>: exact mass from positive ionization mode analysis. [M-H]<sup>-</sup>: exact mass from negative ionization mode analysis.

**Table 4.** Examples of compounds with known antimicrobial properties identified in Quaking Aspen bark extracts.

Compound class	compound name <sup>a</sup>	Presence		Ref.
		Water extract	Methanol extract	
Polyphenols	Hesperidin	-	+	[144, 145]
	Catechol	+	+	[146, 147]
	Medioresinol	+	-	[148, 149]
	Sophoraflavanone G	+	-	[150-152]
	Kaempferol	+	-	[131, 153, 154]
	Fisetin	+	-	[155, 156]
	Apigenin	+	-	[157-159]
	Biochanin A	+	-	[154, 160]
Phenolic acids	Coumaric acid	-	+	[79, 161, 162]
	Caffeic acid	+	+	[129, 163-166]
	Vanillic acid	+	-	[163, 166-168]
	4-hydroxybenzoic acid	+	-	[163, 169]
	3-hydroxybenzoic acid	+	-	[167, 168]
Terpenoids	Confertifolin	-	+	[170, 171]
Glycosylated compound	Phloridzin	-	+	[165, 172, 173]
	Kaempferol 3-O-rutinoside	+	-	[132, 133, 174]
Alkaloids	Berberine	+	-	[175-177]
Others	Nobiletin	-	+	[145, 178]
	Malic acid	-	+	[179-181]
	Hydroxyanthraquinone	-	+	[181-183]
	4-hydroxybenzaldehyde	+	+	[184, 185]
	Coumarin	+	-	[185, 186]

<sup>a</sup> Presented compounds were selected according to their antimicrobial activity demonstrated in recent studies and this activity has been demonstrated on at least two pathogens.

## Supplementary data

**Table S1.** Full data of metabolites (M-H) from quaking aspen methanol extract obtained following UPLC-QTOF-MS analysis with negative ionization mode.

Exact mass (M-H)	Rt	Potential identity	Area under curve
271,069	12,41	Naringenin, Phloretin, Butein ou Arbutin	2852,9
287,066	9,75	Eriodictyol isomer ou Phlorin	2191,7
331,1158	5,29	Galloyl glucose	2115,7
435,1344	10,93	Phloridzin	2090,5
573,1666	13,01	C <sub>36</sub> H <sub>30</sub> O <sub>7</sub> -Uvarinol	1951
285,0872	15,73	Acacetin	1918,8
431,14	10,42	Apigenin-glucoside	1849,7
543,1304	12,41	Diferuloylquinic acid	1839
423,1767	9,94	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>9</sub> -Grandidentatin	1707,1
469,1442	8,64	Valoneic acid dilactone	1533,2
421,1602	9,21	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>9</sub>	1519,5
325,0998	6,21	Coumaric acid glucoside	1513,7
345,1339	5,29	C <sub>16</sub> H <sub>26</sub> O <sub>8</sub>	1308,5
393,1098	13,92	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	953,9
521,1724	7,68	C <sub>28</sub> H <sub>26</sub> O <sub>10</sub>	895,7
575,1824	12,2	Dimethylquercetin	853,8
451,1318	9,7	Chamuvaritin	790,5
301,084	13,32	Hesperidin	773,1
163,0654	7,9	Coumaric acid	758,8
319,0613	7,06	3,4-DHPEA-EDA	717,3
571,2123	5,3	C <sub>30</sub> H <sub>36</sub> O <sub>11</sub>	695,1
329,1043	6,06	Dimethylquercetin	687
377,1151	14,71	3,4DHPEA-EA	645,7
499,149	16,24	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>10</sub>	618,2
433,1198	9,34	Naringenin-glucoside	598,8
393,1194	12,73	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	570,3
323,1502	5,2	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub>	564,6
109,0582	5,99	Catechol	537,4
137,0445	9,96	Hydroxybenzoic acid	497,2
561,2155	9,94	C <sub>29</sub> H <sub>38</sub> O <sub>11</sub>	487,7
321,1371	4,73	Gallic acid gallate	465,7
337,1691	5,17	Coumaroylquinic acid	462,3
335,157	4,69	C <sub>15</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub>	434,8
401,1542	1,45	Nobiletin	428,4

**Table S1 (continued).** Full data of metabolites (M-H) from quaking aspen methanol extract obtained following UPLC-QTOF-MS analysis with negative ionization mode.

Exact mass (M-H)	Rt	Potential identity	Area under curve
487,1998	9,09	Acetylglycitin	416,9
439,1776	8,79	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>9</sub>	413
575,136	9,73	Methylthosterol ferulate ou Procyanidin Dimer	383,6
447,1463	11,49	Luteolin-hexoside	356,4
303,067	9,4	Taxifolin	351,7
424,2017	10,02	C <sub>22</sub> H <sub>33</sub> O <sub>8</sub>	347
179,0711	1,31	Caffeic acid	342,9
483,1639	18,33	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>9</sub>	331,3
461,1678	10,72	Kaempferol-hexoside	330,2
863,2891	10,38	Procyanidin Trimers	329,2
439,127	8,79	C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> O <sub>8</sub>	318,8
447,1667	9,67	Kaempferol-hexoside	311,7
329,2622	13,63	C <sub>15</sub> H <sub>38</sub> O <sub>7</sub>	309,3
424,1917	9,6	C <sub>22</sub> H <sub>33</sub> O <sub>8</sub>	242,2
359,1403	1,34	Lariciresinol	236,7
863,3459	10,38	Procyanidin Trimers	229,7
447,1769	6,8	Kaempferol-hexoside	219,4
575,194	11,03	Methylenecholestanol ferulate ou Procyanidin Dimer	204,3
449,1829	10,89	Eriodictyol-hexoside	203
571,2007	15,75	C <sub>30</sub> H <sub>36</sub> O <sub>11</sub>	171

**Table S2.** Full data of metabolites (M+H) from quaking aspen methanol extract obtained following UPLC-QTOF-MS analysis with positive ionization mode.

Exact mass (M-H)	Rt	Potential identity	Area under curve
249,6912	8,63		8364,6
326,9853	13,05	Butonate	7292,8
122,8692	9,83	4-Hydroxybenzaldehyde	7257,8
152,2319	5,36	C <sub>8</sub> H <sub>39</sub> O	6517,6
121,5811	15,79	1,2,4-Trimethylbenzene	5590,1
225,0530	10,95	Hydroxyanthraquinone	5405,9
148,1674	6,27	C <sub>10</sub> H <sub>27</sub>	5179,5
216,4697	9,95		5134,7
222,1829	10,44	Dihydrozeatin	5001,9
215,0282	9,23	2-Deoxy-D-ribose 1-phosphate	4515,5
161,7838	5,34	isoquinoline-1,5-diol	4190,2
288,0170	7,71	Cyanidin (pigment coloré)	2954,8
227,9560	8,86	H <sub>3</sub> O <sub>14</sub>	2746,1
195,1299	13,98	Gluconic acid	2745,3
327,7507	13,10		2626,8
216,4768	10,33	C <sub>6</sub> H <sub>47</sub> O <sub>6</sub>	2540,5
215,0353	9,52	2-Deoxy-D-ribose 5-phosphate	2357,9
146,8463	5,22	Adipic acid	2194,1
216,4483	8,64	C <sub>14</sub> H <sub>47</sub>	2097,6
144,1000	7,15	(-)-Hygrolone	2053,8
150,8690	6,11	D-Ribofuranose	2043,3
200,8027	1,53		2011,6
233,7107	9,68		1957,6
251,1600	8,15	Arbusculin A	1835,5
292,4727	13,04		1826,0
235,1504	6,57	Confertifolin	1817,6
250,4251	8,68	C <sub>6</sub> H <sub>49</sub> O <sub>8</sub>	1814,9
271,7062	16,28		1776,4
259,9468	8,66	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>9</sub>	1732,8
226,5058	7,38		1710,7
156,3452	5,22	C <sub>9</sub> H <sub>47</sub>	1616,7
145,4903	4,74		1504,2
217,1958	9,97	12-Hydroxydodecanoic acid	1325,9
133,4128	8,67	Malic acid	1289,1
215,7519	9,24		1273,1
233,7070	4,90		1268,7



**Table S2 (Continued).** Full data of metabolites (M+H) from quaking aspen methanol extract obtained following UPLC-QTOF-MS analysis with positive ionization mode.

Exact mass (M-H)	Rt	Potential identity	Area under curve
150,9699	13,69	Thiodiacetic acid	1182,3
152,9186	5,31	C <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	1147,0
150,8749	6,97	Sodium iodide	1110,1
159,0468	1,52	1,4-Naphthoquinone	1101,6
277,6432	4,99		1071,1
267,3015	5,01	C <sub>7</sub> H <sub>38</sub> O <sub>9</sub>	1055,8
273,2144	8,93	Palustradiene	1016,8
148,8508	6,26		987,8
132,0816	8,66	Benzoyl cyanide	978,6
238,0878	10,26	C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> O <sub>9</sub>	856,3
268,7578	6,59		814,0
217,1958	9,66	12-Hydroxydodecanoic acid	790,9
141,4313	4,58	C <sub>5</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	788,1
162,4732	5,32		774,3
340,6401	12,65		719,1
228,6865	8,87		687,1
262,8858	8,34	C <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O <sub>14</sub>	619,6
328,5082	13,01		609,7
183,8970	1,44		577,5
293,2339	13,04	Grevillol	535,8
141,4313	4,20	C <sub>8</sub> H <sub>44</sub>	407,8
130,7846	4,86		395,0
242,3964	8,65	C <sub>8</sub> H <sub>49</sub> O <sub>6</sub>	363,5
217,1744	8,67	12-Hydroxydodecanoic acid	357,3
201,5089	1,52		316,0
262,8780	8,04	C <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O <sub>14</sub>	271,7
126,1111	36,43	gamma-Coniceine	236,5

**Table S3.** Full data of metabolites (M-H) from quaking aspen water extract obtained following UPLC-QTOF-MS analysis with negative ionization mode.

Exact mass (M-H)	Rt	Potential identity	Area under curve
295,1533	14,40	4-Prenylresveratrol	5410,3
315,1832	10,63	Isorhamnetin	3273,7
459,2164	7,24	5-Pentacosylresorcinol	2653,7
329,2584	13,55	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	2593,8
593,2896	11,08	Kaempferol 3-O-rutinoside	2346,3
313,1609	11,46	Cirsimaritin	2328,5
537,2649	9,21	C <sub>32</sub> H <sub>42</sub> O <sub>7</sub>	1923,4
345,1393	5,09	Epirosmanol	1919,8
311,1451	13,05	Caffeoyl tartaric acid	1731,1
387,1865	7,34	Medioresinol	1631,6
299,1870	14,10	Kaempferide	1578,4
137,0339	9,15	4-Hydroxybenzoic acid	1558,7
285,0911	15,56	Kaempferol	1473,0
423,1893	9,79	2,2-Dimethyl-3-(4-methoxyphenyl)-4-ethyl-7-hydroxy- 2H-1-benzopyran-8-methanol diacetate	1425,3
327,1651	7,33	p-Coumaroyl tyrosine	1332,1
153,0332	4,37	Gallic aldehyde	1322,9
137,0339	5,58	3-Hydroxybenzoic acid	1319,9
449,1708	11,92	Myricetin 3-O-arabinoside	1299,6
271,0804	12,20	Arbutin	1228,9
109,0384	5,65	Catechol	1214,6
591,3069	14,43	Sitosterol ferulate	1133,8
163,0541	7,60	4-Coumarate	1103,0
535,2496	9,67	Jaceidin 4'-O-glucuronide	1095,6
423,1942	10,13	Sophoraflavanone G	1082,8
431,1579	10,25	5-Tricosenylresorcinol	1035,9
337,1743	5,01	3-p-Coumaroylquinic acid	1025,3
355,1625	9,93	Ferulic acid 4-O-glucoside	990,7
299,0783	15,93	Kaempferide	899,3
615,2812	9,18	Octyl 3,6-di-O-(alpha-D-mannopyranosyl)-beta-D- mannopyranoside	895,1
521,2712	11,51	Trilobolide	846,0
121,0385	6,85	4-Hydroxybenzaldehyde	828,8
669,3165	8,89	Spinacetin 3-O-glucosyl-(1->6)-glucoside	824,8
285,0666	12,40	Fisetin	804,2
537,2144	6,27	6-O-methyl-N-deacetylisoipecoside	799,7
191,0339	1,31	p-Coumaric acid ethyl ester	745,9

**Table S3 (continued).** Full data of metabolites (M-H) from quaking aspen water extract obtained following UPLC-QTOF-MS analysis with negative ionization mode.

Exact mass (M-H)	Rt	Potential identity	Area under curve
179,0467	1,18	Caffeic acid	700,6
609,2938	8,84	Quercetin 3-O-xylosyl-glucuronide	676,1
187,1118	9,57	Homo-L-arginine	673,6
487,2146	9,10	6"-O-Acetylglycitin	657,1
475,2254	9,65	Ellagic acid acetyl-arabinoside	648,9
293,1385	15,31	Phytuberin	645,5
507,2165	9,96	Gibberellin 2-O-beta-D-glucoside	644,7
133,0229	1,34	(S)-Malate	641,0
471,2184	8,56	Deoxylimonate	625,0
151,0184	4,35	4-Hydroxyphenylacetic acid	618,7
117,0299	2,05	Succinate	604,2
331,1295	14,40	Gallic acid 4-O-glucoside	598,9
477,2510	9,30	Quercetin 3-O-glucuronide	594,1
487,2093	9,41	6"-O-Acetylglycitin	580,7
653,3156	11,05	adipic acid; 2,2-bis(hydroxymethyl)butyl benzoate; isophthalic acid; pentane-1,5-diol	539,2
297,1750	15,23	Glepidotin C	509,0
477,1982	10,16	Quercetin 3-O-glucuronide	506,0
195,0708	1,21	Hydroxycaffeic acid	502,2
287,0781	9,52	Phlorin	499,1
335,1533	4,51	2-Butoxy-2-oxoethyl butyl phthalate	477,1
165,1039	8,76	Methoxyphenylacetic acid	475,7
549,2317	9,42	Quercetin 3-O-(6	469,3
325,1308	9,12	Feruloyl tartaric acid	455,9
167,0509	6,37	Vanillic acid	440,1
465,1720	9,53	Dihydromyricetin 3-O-rhamnoside	438,7
135,0546	7,60	p-Anisaldehyde	437,8
165,0542	1,21	Methoxyphenylacetic acid	426,2
205,1783	22,67	Acetyl eugenol	417,4
571,2360	5,09	(1aR,1bS,4aR,7aS,7bS,8R,9R,9aS)-4a,7b-Dihydroxy-3- (hydroxymethyl)-1,1,6,8-tetramethyl-[...] <sup>a</sup>	411,7
157,0664	3,14	1,4-Naphthoquinone	407,5
343,0677	0,96	5-O-Galloylquinic acid	397,5
421,2471	34,87	Lovastatin acid	396,9
405,1702	6,22	Piceatannol 3-O-glucoside	392,7
627,3199	11,46	Gambogic acid	384,4
171,1150	11,62	Decanoic acid	382,3
325,1308	10,47	Feruloyl tartaric acid	340,8

**Table S3 (continued).** Full data of metabolites (M-H) from quaking aspen water extract obtained following UPLC-QTOF-MS analysis with negative ionization mode.

Exact mass (M-H)	Rt	Potential identity	Area under curve
283,1760	7,96	Geraldone	338,6
157,1391	17,85	1,4-Naphtoquinone	319,7
461,2493	11,54	5-Pentacosylresorcinol	288,8
201,0444	0,94	Bergaptol	284,9
421,1380	5,30	Picrasin F	276,3
493,2357	8,48	Microlenin	257,3
309,1358	13,08	Cinnamoyl glucose	236,9
491,2299	8,87	Isorhamnetin 3-O-glucuronide	214,4

<sup>a</sup>(1aR,1bS,4aR,7aS,7bS,8R,9R,9aS)-4a,7b-Dihydroxy-3-(hydroxymethyl)-1,1,6,8-tetramethyl-5-oxo-1,1a,1b,4,4a,5,7a,7b,8,9-decahydro-9aH-cyclopropa[3,4]benzo[1,2-e]azulene-9,9a-diyl dibenzoate

**Table S4.** Full data of metabolites (M+H) from quaking aspen water extract following UPLC-QTOF-MS analysis with positive ionization mode.

Exact mass (M+H)	Rt	Potential identity	Area under curve
287,0954	9,5	Fisetin	13755,2
282,2869	26,6	Oleamide	12785,6
287,0954	15,6	Kaempferol	6690,1
301,0838	15,9	3-Methoxyapigenin	4642,4
254,2584	23,8	Octadecyl	4501,2
563,5732	26,6	Oleic acid, eicosyl ester	4161,9
273,0878	12,2	Pinobanksin	4142,8
256,2760	26,0	1-Heptadecanamine	3839,0
165,0511	1,0	D-Rhamnose	3514,9
287,1035	11,4	Salicin	3157,5
228,2430	23,0	1-Dodecylguanidine	3050,1
781,2897	10,8	3,3'-(Methylenedi-4,1-phenylene)bis(2,4,5-triphenyl-2,4-cyclopentadien-1-one)	2566,1
373,1422	11,9	Syringin	2565,2
107,0503	5,1	Aromatic aldehyde	2488,9
184,0484	1,0	4-Pyridoxate	2402,3
142,0390	1,0	Carbamoyl phosphate	2216,7
564,3776	8,2	N,N'-Didodecyl-6-(trichloromethyl)-1,3,5-triazine-2,4-diamine	2203,9
520,3510	7,9	C <sub>32</sub> H <sub>45</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	2182,7
123,0455	9,6	4-Hydroxybenzaldehyde	1959,8
608,4004	8,5	9-sec-Butyl-6-(1-ethyl-1H-indol-3-yl)-3-(6-oxooctyl)octahydro-[...] <sup>a</sup>	1928,2
476,3257	7,5	4-Amino-3-[[3-amino-6-(aminomethyl)-3,4-dihydro-2H-pyran-2-yl]oxy]-6-[...] <sup>b</sup>	1808,5
449,1325	9,1	Fisetin 8-C-glucoside	1585,8
652,4316	8,7	1-Deoxy-1-[dodecanoyl(nonyl)amino]-4-O-hexopyranosylhexitol	1536,5
279,1578	5,0	2-Ethylhexyl phthalate	1451,6
408,1826	10,8	C <sub>25</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>4</sub>	1438,7
503,3298	7,9	C <sub>33</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub>	1391,4
147,0472	7,6	Coumarin	1365,7
425,1993	9,8	Chitobiose	1346,2
459,2998	7,5	11,17-Dihydroxy-3,20-dioxopregna-1,4-dien-21-yl 3,3-dimethylbutanoate	1340,6
547,3581	8,2	Tri-2-octanyl 1,2,4-benzenetricarboxylate	1328,7
373,1422	9,8	Syringin	1311,8
139,9936	34,9	4-Nitrophenol	1276,6
193,0568	8,2	Citrate	1270,2

**Table S4 (continued).** Full data of metabolites (M+H) from quaking aspen water extract following UPLC-QTOF-MS analysis with positive ionization mode.

Exact mass (M-H)	Rt	Potential identity	Area under curve
573,2514	5,1	adipic acid; 2-ethylhexanoic acid; 2-ethyl-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol; isobenzofuran-1,3-dione	1252,2
546,2267	13,8	3-Glycoloyl-3,5,12-trihydroxy-10-methoxy-6,11-dioxo-1,2,3,4,5a,6,11,11a-octahydro-1-tetracenyl 3-amino-2,3,6-trideoxyhexopyranoside	1244,3
271,1084	13,6	Apigenin	1220,3
285,0903	15,7	Biochanin A	1218,2
213,1013	5,1	Benzoin	1182,6
140,0050	1,0	4-Nitrophenol	1169,0
268,2797	25,2	3-(Tetradecyloxy)propanenitrile	1146,0
432,3024	7,2	2-[4-(7-Methoxy-2,2-dimethyl-3-phenyl-3,4-dihydro-2H-chromen-4-yl)phenoxy]-N,N-dimethylethanamine	1095,8
375,1638	7,2	Secologanate	1048,3
107,0503	12,0	D-Glycerate	1017,1
202,0671	1,0	Simazine	1012,4
415,2709	7,2	Diosgenin	999,7
339,1214	10,1	(-)-Glyceollin I	963,6
253,0986	10,3	1-Hydroxy-2,3-dimethyl-9,10-anthraquinone	939,6
591,3834	8,4	1,4:5,9-Dianhydro-1-[9-(2-carboxy-3-hydroxy-4-methylphenyl)-6-hydroxy-...]	923,7
696,4679	8,9	3-(2-Naphthyl)-N-palmitoyl-L-alanyl-L-alpha-glutamyl-L-leucine	903,2
181,0349	1,0	D-Glucose	867,0
161,0354	1,0	2-Oxadipate	836,4
249,0927	12,0	1-Hydroxy-6-methoxypyrene	813,5
105,0374	10,8	Hydroxypyruvate	811,0
815,3554	9,8	C <sub>42</sub> H <sub>54</sub> O <sub>16</sub>	736,6
423,1863	9,3	C <sub>25</sub> H <sub>26</sub> O <sub>6</sub>	727,8
271,0766	12,2	Apigenin	684,2
393,1235	14,3	1,5-Diphenoxy-anthraquinone	680,9
337,1196	11,9	Berberine	668,3
149,0311	22,5	trans-Cinnamate	619,8
181,0349	34,9	D-Hexose	612,4
124,0296	1,0	Nitrobenzene	602,1
119,0215	1,0	Succinate	600,7
245,0922	9,5	Gentisein	561,2
284,0619	1,0	2-tert-Butyl-4,6-dinitrophenyl carbamate	560,0
167,0524	1,0	D-Xylonate	554,1
798,3342	10,8	C <sub>41</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>15</sub>	541,8

**Table S4 (continued).** Full data of metabolites (M+H) from quaking aspen water extract following UPLC-QTOF-MS analysis with positive ionization mode.

Exact mass (M-H)	Rt	Potential identity	Area under curve
373,1422	10,8	Syringin	531,1
415,1526	10,3	10-Hydroxy-5-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-5,8,8a,9-tetrahydrofuro[3',4':6,7]naphtho[2,3-d][1,3]dioxol-6(5aH)-one	498,9
<sup>a</sup> 9-sec-Butyl-6-(1-ethyl-1H-indol-3-yl)-3-(6-oxooctyl)octahydro-2H-pyrido[1,2-a][1,4,7,10]tetraazacyclododecine-1,4,7,10(3H,12H)-tetrone			
<sup>b</sup> 4-Amino-3-{{[3-amino-6-(aminomethyl)-3,4-dihydro-2H-pyran-2-yl]oxy}-6-(ethylamino)-2-hydroxycyclohexyl 3-deoxy-4-C-methyl-3-(methylamino)pentopyranoside			
<sup>c</sup> 1,4:5,9-Dianhydro-1-[9-(2-carboxy-3-hydroxy-4-methylphenyl)-6-hydroxy-5,7-dimethyl-4-oxononan-3-yl]-2,3,6,7-tetradeoxy-4-ethyl-8-C-ethyl-2,9-dimethylnonitol			

## CHAPITRE III

### DISCUSSION

#### 3.1 Retour sur la problématique et les résultats

Comme il a été mentionné précédemment dans ce mémoire, les industries forestières québécoises font face à une problématique liée à la sous-exploitation de la biomasse qu'elles génèrent. En effet, ces industries connaissent actuellement une baisse d'activité dans différents secteurs, causée par une diminution de la demande de certains produits ce qui mène à de plus faibles revenus et par le fait même, des pertes d'emplois. Il y a donc une nécessité de développer de nouveaux marchés pour la biomasse forestière qui est disponible, abondante et très variée sur le territoire québécois. L'une des méthodes mises de l'avant pour revaloriser celle-ci est le développement de PHVA grâce aux propriétés biologiques des nombreux MS produits par les différentes espèces sylvoicoles utilisées dans l'industrie. Actuellement, les MS d'arbres québécois ne sont pas, ou très peu, valorisés alors que plusieurs études rapportent le potentiel biologique que plusieurs d'entre eux possèdent. De plus, les consommateurs se soucient de plus en plus de l'environnement et de la composition chimique des produits qu'ils consomment et ces tendances plus « vertes » favorisent la vente de produits naturels. Ainsi, il existe un important besoin de développer de nouveaux produits naturels dans différents secteurs tels que la pharmaceutique, la cosméceutique, la nutraceutique et plusieurs autres [2, 187]. Par ailleurs, l'un des secteurs qui s'intéressent particulièrement à l'activité biologique des MS d'origine végétale est celui du développement d'agents antimicrobiens. En effet, dû à l'émergence perpétuelle de microorganismes pathogènes résistants, il est impératif de développer continuellement de nouveaux agents biocides et les espèces végétales peuvent s'avérer une source importante de ces composés [87, 88]. Cependant, il existe, pour le moment, encore très peu d'études exhaustives reliant la composition chimique des



différentes espèces d'arbres québécois de l'industrie forestière avec les activités biologiques des molécules qu'elles produisent.

Ainsi, le laboratoire d'Isabel Desgagné-Penix et les chercheurs d'Innofibre se sont d'abord questionnés sur la possibilité d'extraire des MS ayant des propriétés antimicrobiennes chez ces diverses essences d'arbre. En effet, sachant que les espèces végétales synthétisent de nombreux MS complexes assurant la défense de l'organisme contre divers agents nocifs externes (bactéries, champignons, insectes, parasites, etc.), il est plausible que certaines de ces molécules puissent agir comme agents bactériostatiques et/ou bactéricides contre plusieurs microorganismes pathogènes affectant l'humain et les animaux [29, 30]. Plus précisément, l'équipe s'est intéressée à la nature des MS produits par le PFT et leur potentiel antimicrobien. En effet, parmi la biomasse forestière sous-exploitée, on retrouve notamment une large proportion de résidus de sciage (écorces) provenant du PFT, un feuillu très utilisé dans de nombreuses scieries québécoises en raison de sa grande disponibilité et pour certaines de ses propriétés physico-chimiques [2]. Bien que les études sur la composition chimique de cette essence soient plutôt rares, certaines, telles que Silici et Kutluca (2005) et Vardar-Ünlü, Silici et Ünlü (2008) rapportent chez cette espèce la présence de plusieurs familles de composés reconnues pour leur forte bioactivité. Cela laisse croire que certains de ces MS peuvent avoir un potentiel antimicrobien. Pour ces raisons, les résidus de sciage du PFT s'avèrent une matière de choix pour le développement d'agents antimicrobiens naturels.

L'objectif général de cette recherche était donc de déterminer la composition chimique des extraits d'écorce du PFT et d'évaluer l'activité antimicrobienne de ces extraits. En comparaison à plusieurs autres études qui évaluent l'activité biologique d'extraits d'origine naturelle, notre étude s'interroge davantage sur le potentiel commercial du PFT. En effet, celle-ci a été réalisée dans l'optique d'une éventuelle production industrielle en déterminant les paramètres de préparation et d'extraction de la matière première les plus avantageux.

Pour répondre à l'objectif principal, l'équipe a opté pour des méthodes d'extraction efficaces et relativement simples qui étaient à disposition, soit la macération par Soxhlet et à l'aide d'un ASE. Ces deux systèmes permettent généralement un rendement en extractible supérieur à une macération standard pour une durée beaucoup plus courte. Tout d'abord, le potentiel d'approvisionnement en extractibles à partir des écorces de PFT a été évalué puis comparé à la teneur en extractibles d'autres essences d'arbre et aussi par rapport aux autres composantes chimiques dans cette matrice. La quantification des extractibles et des composés lignocellulosiques des écorces de PFT ont permis de déterminer que les écorces de PFT contiennent une proportion relativement élevée en extractibles et une proportion plutôt faible en matières lignocellulosiques par rapport à la moyenne des autres essences d'arbres québécois rapportés par Browne *et al.* (2009) (voir figure 1B et tableau 1.2). Ces résultats soulignent la pertinence d'exploiter les écorces de PFT en priorisant les extractibles aux composés lignocellulosiques. Ensuite, nous avons décidé d'évaluer quels traitements de la matière première et aussi quels solvants sont à prioriser pour obtenir les rendements en extractibles les plus élevés. L'évaluation des rendements en extractibles et l'évaluation de la teneur en cendre en fonction de la fraction granulométrique présentées aux figures 1A et 1C ont permis de déterminer que la fraction < 3 mm semblait contenir des contaminants inorganiques qui abaissent les rendements et qu'il est préférable de retirer cette fraction préalablement à l'extraction. Aussi, les rendements en extractibles en fonction du solvant d'extraction ont révélé que ce sont les solvants ayant une plus grande constante diélectrique (polarité plus élevée) qui permettent les meilleurs rendements (voir figure 1D). Ainsi, pour un usage industriel, cette étude suggère d'utiliser le méthanol, l'éthanol, l'eau ou l'acétone pour une extraction efficace des MS, d'autant plus que ces solvants ont l'avantage d'être moins coûteux et nocifs pour l'humain et l'environnement que la majorité des autres testés dans cette étude.

Ensuite, pour connaître le potentiel antimicrobien de l'ensemble des extraits d'écorce de PFT, leur activité a été évaluée sur huit microorganismes couramment présents dans les hôpitaux et en production alimentaire, pouvant causer des pathologies chez les humains et les animaux. Aussi, pour s'assurer du large spectre d'actions de nos extraits, les microorganismes choisis étaient de différents règnes et variés au niveau de la

physiologie, soit trois bactéries à Gram -, deux bactéries à Gram +, deux levures et une moisissure. Parmi le grand choix de techniques existantes pour évaluer l'activité antimicrobienne, nous avons choisi d'utiliser la méthode de microdilution en bouillon qui présente plusieurs avantages par rapport aux autres méthodes et qui semblait adéquate pour répondre aux besoins de cette étude. Cette méthode, approuvée par le CLSI, permet d'évaluer rapidement et efficacement la MIC ce qui est un avantage par rapport aux méthodes de diffusion sur gélose. La méthode de microdilution en bouillon ne nécessite pas de grandes quantités d'extraits et de consommables ce qui en fait une méthode économique par rapport aux méthodes de macro dilution ou encore de diffusion par gradient. En deuxième lieu, notre équipe s'est également intéressée à l'effet bactéricide de ces extraits en déterminant la MBC/MFC grâce à l'absence de croissance sur gélose. Déterminer à la fois l'effet bactériostatique (MIC) et l'effet bactéricide (MBC/MFC) permet de mieux orienter les applications possibles de nos extraits. Par exemple, un extrait bactéricide à faible concentration est plus adéquat pour la formulation de produits désinfectants à l'inverse d'un produit bactériostatique à une même concentration.

Ainsi, grâce à cette méthode, il a été possible de déterminer que l'extrait à l'eau possède le plus grand potentiel antimicrobien en inhibant les huit microorganismes et en ayant un effet bactéricide sur trois d'entre eux. Aussi, l'extrait au méthanol et l'extrait acide-base (méthode spécifique pour concentrer les alcaloïdes) présentaient également un potentiel antimicrobien intéressant en inhibant trois et quatre microorganismes respectivement. En ce qui concerne les autres extraits, ceux-ci n'avaient pas ou très peu d'activité (voir table 1, Chapitre 2). Puisque les résultats présentés à la figure 1D démontrent un très faible rendement en extractible pour la méthode acide-base comparativement à l'extraction à l'eau et au méthanol, l'extrait acide-base a été écarté pour l'étape d'analyses de la composition chimique. En effet, ce type d'extraction ne serait pas rentable à l'échelle industrielle par rapport aux valeurs de MIC obtenues à partir de cet extrait. Les résultats obtenus suite à cette analyse n'ont pas permis d'établir de lien entre l'efficacité antimicrobienne et le type de microorganisme vulnérable puisque l'activité antimicrobienne observée vise des espèces de règne et de physiologie distincts. L'effet ne semble pas être plus marqué sur un type de pathogène à l'inverse de l'étude de

Vardar-Ünlü, Silici et Ünlü (2008) qui avait démontré une activité des extraits de bourgeons de peuplier beaucoup plus spécifique contre les bactéries de type Gram +. Par contre, notre étude corrobore plusieurs autres études qui démontrent que les extraits de végétaux, en raison de la complexité de leur composition chimique, possèdent une activité antimicrobienne à large spectre d'action en étant efficaces sur plusieurs types de pathogènes différents [125, 127, 188].

Puisqu'aucune étude ne s'est attardée à ce jour sur la composition chimique des composés non volatils dans les écorces de PFT, notre équipe de recherche s'est particulièrement intéressée à la caractérisation des molécules contenues dans cette biomasse à l'aide d'analyses par chromatographie liquide pour compléter la caractérisation des extraits de PFT par chromatographie gazeuse et par tests colorimétriques réalisés par Diouf, Stevanovic et Cloutier (2009), Fernandez, Watson et Breuil (2001) ainsi que Vardar-Ünlü, Silici et Ünlü (2008). Connaître la composition chimique des extraits permet d'émettre des hypothèses sur la nature des composés responsables de l'efficacité antimicrobienne, mais aussi pour d'autres propriétés biologiques d'intérêt. Pour ce faire, notre équipe a d'abord débuté par une caractérisation grossière par CCM, une méthode très rapide, peu coûteuse permettant de comparer le profil chimique des différents extraits. Cela a permis entre autres de visualiser rapidement le type de composés que chaque solvant d'extraction permettait de récupérer et lesquels semblaient extraire des substances similaires. Ensuite, nous avons privilégié l'analyse par UPLC-QTOF-MS afin d'identifier spécifiquement les composés dans nos extraits sur la base de leur masse exacte. Cet appareil offre une plus grande résolution et permet une séparation des composés plus rapide que les méthodes par LC standard ou même par LC haute performance (HPLC). De plus, il offre une meilleure précision de la masse exacte qu'un analyseur quadripolaire utilisé seul ce qui en fait un appareil intéressant pour cette étude. Cependant, puisqu'il s'agit d'une technique relativement coûteuse, nous avons choisi d'effectuer la caractérisation des extraits les plus prometteurs en terme d'activité antimicrobienne, soit les extraits à l'eau et au méthanol.

Grâce à ces analyses, il a été possible de démontrer que ces extraits contenaient majoritairement des molécules fortement polaires (faible  $R_f$ ) dont principalement des composés phénoliques tels que des polyphénols, des acides phénoliques et des composés phénoliques glycosylés (voir figure 2 ainsi que les tables 2 et 3 du Chapitre 2). Il est également possible d'observer dans ces tableaux que les extraits contiennent également quelques alcaloïdes et terpénoïdes. Au total, l'analyse UPLC-QTOF-MS a permis d'identifier et de catégoriser 39 et 53 composés dans l'extrait au méthanol et à l'eau respectivement. Aussi, les résultats de CCM ont démontré que les deux extraits ont un profil chimique non identique, mais assez similaire à l'inverse des autres solvants moins polaires tels que le chloroforme, le dichlorométhane et l'hexane. Bien que les groupes de molécules fussent similaires dans l'extrait au méthanol et à l'eau, l'identification spécifique des MS a révélé que peu de composés se retrouvent dans les deux extraits à la fois. Ainsi, le solvant semble être un élément déterminant dans la spécificité des MS pouvant être extraits.

L'étude de ces molécules dans la littérature a révélé que 22 parmi celles-ci sont reconnues pour leurs propriétés antimicrobiennes (voir table 4). De ces 22 molécules antimicrobiennes, une plus grande majorité se retrouve dans l'extrait à l'eau. Cela pourrait expliquer pourquoi cet extrait a une efficacité antimicrobienne supérieure à celle de l'extrait au méthanol. En fonction de leur abondance relative, le 4-hydroxybenzaldehyde (5,45 %) et le kaempferol (5,03 %) semblaient être les molécules antimicrobiennes les plus abondantes dans l'extrait au méthanol et à l'eau respectivement. Finalement, l'étude de la structure chimique des molécules antimicrobiennes produites par le PFT a révélé que neuf parmi celles-ci ont une structure de base commune qui est celle des flavonoïdes, un sous-groupe des composés phénoliques (voir figure 3). Cette observation a laissé supposer que le PFT ait un avantage à synthétiser ce type de composés afin de les utiliser comme des toxines pour se défendre contre les stress biotiques.

### 3.2 Limites et perspectives

Premièrement, il est important de mentionner que cette étude comporte quelques limites théoriques et méthodologiques et il est pertinent de les identifier afin de garder un esprit critique sur les résultats obtenus ainsi que pour mieux orienter les travaux futurs. En premier lieu, la méthode analytique utilisée dans cette étude pour identifier les composés, soit la caractérisation par UPLC-QTOF-MS, présente certaines limites. D'abord, les masses exactes mesurées par cet appareil ont un degré de confiance de 3 ppm. De plus, cette méthode permet l'identification d'un pic du chromatogramme à la suite d'une concordance entre la valeur de  $m/z$  obtenue expérimentalement et la valeur dite « théorique » retrouvée dans l'une des bases de données du logiciel MZMine 2.0. Cette concordance ne permet pas d'identifier les composés avec une certitude absolue, mais plutôt avec une tolérance de  $m/z$  préalablement établie dans le logiciel. Il arrive également que plusieurs concordances soient possibles et l'algorithme du logiciel donne plus d'un candidat pour un pic, principalement lorsque le rapport masse sur charge de ce pic est supérieur à 400  $m/z$ . Il est donc impossible de se prononcer sur l'identification de la molécule détectée et on parle plutôt d'une identification potentielle. Aussi, les molécules identifiées se limitent à celles qui se retrouvent dans les bases de données liées au logiciel MZMine 2.0, soit la base de données du CRIQ composée essentiellement de métabolites végétaux ainsi que les bases de données publiques Chempider, Kegg Compounds Database et LipidMaps Database. Bien que ces bases de données possèdent un nombre très élevé de métabolites, par exemple plus de 63 millions de structures pour la base Chempider, plusieurs composés détectés dans nos extraits n'ont pas été identifiés et seules leurs formules brutes ont été rapportées [189]. Il est donc possible que certaines molécules présentes dans nos extraits de PFT n'aient pas été rapportées dans les bases de données utilisées par MZMine 2.0 alors que celles-ci sont responsables de l'activité antimicrobienne chez les extraits de PFT. De plus, l'appareil utilisé possède également une limite de détection de 1 ppm. Ainsi, les composés ayant une concentration inférieure à la limite de détection dans nos extraits ne peuvent pas être rapportés dans cette analyse [123]. Encore une fois, il est possible que certains composés d'intérêt ayant une forte bioactivité, même à faible concentration, n'aient pas été détectés. Finalement, les résultats obtenus par analyse UPLC-QTOF-MS ne permettent pas de quantifier les composés dans



nos extraits. En effet, les valeurs d'aire sous la courbe déterminées pour l'ensemble des composés détectés sont fonction du degré d'ionisation de la molécule concernée. Les valeurs d'aire sous la courbe peuvent donc donner une idée grossière de l'abondance relative des différents composés présents, mais ne permettent pas de quantifier la concentration de ces molécules dans les extraits de PFT.

Ainsi, dans cette étude, pour pousser la caractérisation des composés d'intérêt plus loin, il serait suggéré d'augmenter le degré de confiance de l'identification des composés et ajouter des éléments de discrimination lorsque qu'il y a plus d'une concordance pour un composé donné. Pour ce faire, il serait adéquat de combiner différentes méthodes analytiques. Par exemple, l'analyse par résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique très utilisée pour l'identification des composés parce qu'elle permet d'avoir des informations sur la nature et le nombre d'atomes de la molécule, les liaisons chimiques, la conformation moléculaire, etc [190, 191]. Il serait donc possible de lier cette technique à de la LC pour analyser les extraits comme le suggère Moco. *et al* (2007). Aussi, la spectrométrie de masse peut s'effectuer avec une grande variété d'analyseurs autres que le quadripôle à temps de vol tels que la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS), le piège à ions quadripolaire (QIT), le piège linéaire quadripolaire (LTQ-Orbitrap), etc. [192]. L'ensemble des informations obtenues par ces analyses telles que la masse exacte, le RT, la concordance spectrale des ions fils et le patron isotopique sont des caractéristiques généralement très spécifiques à un composé qui peuvent augmenter le degré de confiance d'une identification [190, 193]. Il serait également possible d'effectuer de la chromatographie bidimensionnelle, soit l'utilisation de deux colonnes ayant des propriétés distinctes (diamètre, longueur, nature de la phase stationnaire, etc.). Cette méthode permet d'abord de mieux séparer les composés, mais aussi de faire le pairage des indices de rétention et ainsi mieux discriminer lorsqu'il y a plusieurs concordances pour un pic donné [194]. Cependant, le défi repose sur la comparaison de l'ensemble des résultats qui seraient générés par ces méthodes avec les valeurs des bases de données. En effet, les résultats expérimentaux et les valeurs de la base de données doivent idéalement provenir d'analyses effectuées dans les mêmes conditions expérimentales. Pour ce faire, il serait plutôt pertinent de se procurer les standards des métabolites potentiellement

présents dans nos extraits et qui nous intéressent, pour comparer ceux-ci avec nos extraits selon les mêmes conditions expérimentales. Finalement, le fait de se procurer les standards des MS d'intérêt pourrait nous permettre non seulement de confirmer leur présence dans l'extrait, mais également de les quantifier en effectuant des courbes d'étalonnages.

En deuxième lieu, plusieurs études rapportent que la teneur en MS chez le PFT peut varier selon une multitude de facteurs, tels que le lieu et le moment de récolte de la biomasse [142, 143]. Cependant, actuellement, il n'y a aucune étude exhaustive sur la nature et la concentration des MS produits par le PFT en fonction des variables géographiques, écologiques et climatiques. Aussi, d'autres études rapportent que les concentrations des différents MS dans un extrait peuvent varier dans le temps en raison de la stabilité des molécules et des effets de dégradation causés, entre autres, par la température, la lumière et l'activité enzymatique [195, 196]. Ainsi, il est impossible de garantir l'activité antimicrobienne de nos extraits puisque la teneur des métabolites actifs peut varier en fonction de ces différents facteurs. Pour surmonter cette limite, l'une des perspectives envisagées serait d'effectuer un large échantillonnage de différents lots d'écorce à des périodes, lieux, climats et âges divers et évaluer la variabilité de la composition entre les différents extraits. Des études d'Osier, Hwang et Lindroth (2000) et de Lindroth *et al.* (2002) ont d'ailleurs effectués des analyses de variance de la nature et de la teneur en métabolites chez le PFT en fonction de la disponibilité des nutriments et en fonction du moment de récolte à l'aide du test ANOVA [142, 143]. Ensuite, il serait intéressant de faire des tests de corrélation et de liaison entre la nature et la concentration des métabolites et les différentes variables liées à la récolte de la matière première et celles liées à la conservation des extraits. Des analyses multivariées, à l'aide de logiciels statistiques, seraient également suggérées afin d'évaluer l'effet de la combinaison des différentes variables [197]. Toutefois, ces analyses demeurent laborieuses et très complexes vu le nombre de paramètres impliqués et le nombre d'échantillonnages nécessaires.

Outre les variables liées à la récolte et la stabilité des métabolites, d'autres facteurs peuvent modifier et limiter l'effet antimicrobien obtenu avec nos extraits. En effet, pour



compliquer le tout, il peut exister des effets synergiques et/ou antagonismes entre les métabolites. Dans un mélange aussi complexe qu'un extrait végétal, il existe très peu de façons permettant de prédire et de contrôler ces effets entre les composés lorsque leurs mécanismes d'action ne sont pas connus [32, 38]. Cela explique l'importance de considérer tous les métabolites d'un extrait dans un ensemble plutôt que d'étudier ceux-ci individuellement. L'une des solutions envisagées pour diminuer ces effets ou pour mieux les comprendre serait le fractionnement des extraits. Le fractionnement, qui peut s'effectuer par chromatographie en mode préparatif automatisé, permettrait de diminuer le nombre de molécules par extrait et par le fait même diminuer les interactions. Des extraits fractionnés faciliteraient également l'étude des corrélations entre les métabolites et les variables liées à la récolte et à la dégradation abordées plus haut. Finalement, le fait de simplifier au maximum un extrait en diminuant le nombre de métabolites permettrait de procéder plus facilement à l'homologation d'un produit qui contiendrait cet extrait [198, 199]. Toutefois, le fractionnement possède également quelques inconvénients. D'abord, il peut supprimer les interactions favorables entre les molécules, c'est-à-dire dans le cas où l'activité antimicrobienne est due à un effet synergique ou additionnel entre ces métabolites. Aussi, puisque les concentrations en MS dans les extraits de végétaux sont généralement très faibles et parce que le fractionnement peut occasionner des pertes de rendement, il serait nécessaire d'utiliser un plus gros volume en matière première pour générer des extraits suffisamment concentrés en MS actifs. Finalement, le fractionnement nécessite une plus grande quantité de consommables ce qui augmenterait les coûts de procédés d'extraction. Pour la suite du projet, il serait donc intéressant d'évaluer le potentiel antimicrobien des extraits fractionnés pour déterminer si le fractionnement est une étape favorable ou non dans le processus d'extraction.

Quelques limites peuvent également être soulevées en ce qui concerne la méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne utilisée dans ce projet, soit la microdilution en bouillon selon le protocole du CLSI. D'abord, cette méthode visuelle peut devenir subjective, car elle est due à la perception de l'expérimentateur et celle-ci est plus sensible aux causes d'erreurs puisqu'elle n'est pas automatisée. De plus, le protocole suivi dans cette étude ne tient pas en compte la cinétique des composés antimicrobiens de l'extrait,

car il ne permet pas d'évaluer l'efficacité en fonction du temps [121, 122, 200]. Généralement, pour un usage concret, il est souhaitable que les agents antimicrobiens soient efficaces le plus rapidement possible, que cet effet soit irréversible et qu'il persiste dans le temps. Ainsi, pour compléter l'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits de cette étude, il serait adéquat de procéder à d'autres techniques. D'abord, la méthode par spectrophotométrie développée et standardisée par the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), qui utilise un lecteur de microplaque, ce qui amène plus d'objectivité dans les résultats obtenus. De plus, celle-ci peut se faire de manière automatisée avec un injecteur [200, 201]. En ce qui concerne la cinétique des agents antimicrobiens, il serait suggéré d'effectuer le « time-kill test » également développé et standardisé par le CLSI. Cette méthode permet d'obtenir de l'information sur l'interaction dynamique entre l'agent actif et la souche bactérienne ou fongique à différents intervalles de temps [200, 202]. Cette méthode renseigne sur le nombre total d'unités formatrices de colonies viables plutôt que sur la MIC. Ainsi, l'efficacité antimicrobienne est exprimée différemment, c'est-à-dire en log de réduction calculé par rapport à la concentration de l'inoculum de départ. De cette manière, il est possible de savoir à quel moment l'efficacité antimicrobienne débute, à quel moment l'effet bactéricide ou fongicide est total et si cet effet persiste dans le temps. Il s'agit d'une méthode quantitative complémentaire afin de déterminer la concentration en microorganismes viables à différents temps, mais qui peut aussi se déterminer à différentes concentrations d'extrait [127, 203]. Les travaux de Klancnik *et al.* (2010) et Othman *et al.* (2011) sont de bons exemples d'étude de la mesure de la concentration en microorganismes viables en fonction du temps et de la concentration en extraits naturels antimicrobiens.

En dernier lieu, l'étude dans son ensemble ne permet pas d'associer l'activité antimicrobienne à des composés précis. Elle permet plutôt, sur la base de recherches antérieures, d'identifier les composés susceptibles d'être la cause de l'effet antimicrobien. Il serait donc intéressant de pouvoir identifier spécifiquement les composés antimicrobiens dans nos extraits de PFT. Il est évident qu'isoler et purifier un composé dans un extrait naturel est une tâche ardue, principalement en raison du nombre de

composés présents ainsi que leur concentration respective qui est faible pour la majorité. Il existe cependant des méthodes plus simples qui permettent de mieux cribler les composés antimicrobiens. À titre d'exemple, il y a l'évaluation de l'activité antimicrobienne par bioautographie. Cette méthode existe en multiples variantes telles que la bioautographie directe, par recouvrement de gélose et par diffusion sur gélose. Il s'agit d'une méthode basée sur la CCM qui permet de séparer les composés d'un extrait sur une plaque et de mettre celle-ci en contact avec un inoculum de microorganisme. Les zones d'inhibition de la prolifération du microorganisme indiquent la présence d'un ou de plusieurs composés antimicrobiens à une valeur de  $R_f$  précise [204, 205]. Ensuite, en effectuant une autre CCM, il est possible d'associer les  $R_f$  des composés antimicrobiens avec les « spots » révélés à l'aide de réactifs colorés ou de lumière UV. Ainsi, il est possible d'avoir une idée de la nature des composés antimicrobiens dans l'extrait. Par exemple, les composés qui se colorent au contact du réactif Dragendorff sont généralement des alcaloïdes alors que ceux qui réagissent en présence de chlorure de fer III ( $\text{FeCl}_3$ ) sont plutôt des composés phénoliques [119, 120]. Sachant le  $R_f$  du composé actif, il est possible de purifier ce composé par chromatographie sur colonne comme le suggère l'étude de Shai *et al.* (2008) et ensuite, l'identifier grâce à une analyse par MS.

### 3.3 Conclusion

Pour conclure, l'ensemble des résultats obtenus dans cette étude démontre bel et bien le potentiel du PFT dans le développement de PHVA, en particulier pour la production d'agents antimicrobiens. Pour ce faire, les travaux ont démontré qu'il serait adéquat de prioriser l'extraction à l'eau ou au méthanol pour obtenir les extraits avec la meilleure efficacité antimicrobienne parmi ceux évalués dans cette étude. Ces extractions ont permis aussi d'obtenir des rendements en extractibles relativement élevés ce qui était favorable pour l'exploitation du PFT à une échelle industrielle.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Ministère des ressources naturelles et de la faune: **Vers la valorisation de la biomasse forestière** In. Edited by Direction du développement de l'industrie des produits forestiers. Québec (Québec): Bibliothèque et Archives nationales du Québec; 2008.
2. Royer M, Houde R, Viano Y, Stevanovic T: **Non-wood Forest Products Based on Extractives-A New Opportunity for the Canadian Forest Industry Part 1: Hardwood Forest Species**. *Journal of Food Research* 2012, 1(3):8.
3. Ministère des ressources naturelles et de la faune: **La forêt, pour construire le Québec de demain**: Direction des communications, Ministère des ressources naturelles et de la faune; 2008.
4. Ministère des ressources naturelles et de la faune: **La filière du bioraffinage : une chimie verte**. Québec: Gouvernement du Québec; 2013.
5. Browne T, Paice M, Jemaa N, Paleologou M, Zhang X, Champoux M: **Le bioraffinage forestier : Possibilité pour les entreprises québécoises de pâtes et papiers** In. Edited by Ministère des Ressources naturelles et de la Faune. Québec (Québec): Gouvernement du Québec; 2009: 40.
6. Celhay C, Mathieu CE, Candy L, Vilarem G, Rigal L: **Aqueous extraction of polyphenols and antiradicals from wood by-products by a twin-screw extractor: Feasibility study**. *Comptes Rendus Chimie* 2014, 17(3):204-211.
7. Eugène Gagné: **Panel d'experts : La filière des extractibles agroforestiers au Québec**. In. Edited by forestières Fdc. Orford; 2018.
8. Janowiak MK, Webster CR: **Promoting ecological sustainability in woody biomass harvesting**. *Journal of forestry* 2010, 108(1):16-23.
9. Parent G, Boulay É, Fortin C: **Ressources et industries forestières : Portrait statistique** In. Edited by Ministère des Ressources naturelles et de la Faune, 2012 edn. Québec (Québec); 2012: 88.
10. Salmon D: **Ressources et industries forestières: portrait statistique**: Québec, Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs; 2016.

11. Royer M, Houde R, Stevanovic T: **Potentiel de développement lié aux extractibles forestiers : État des connaissances et revue des marchés : Volet 1 : Les extractibles forestiers Québécois**

Québec: Quebec Wood Export Bureau; 2010.

12. **Biomass Compositional Analysis Laboratory Procedures**  
[<https://www.nrel.gov/bioenergy/biomass-compositional-analysis.html>]
13. Zhu J, Pan X: **Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: technology and energy consumption evaluation.** *Bioresource technology* 2010, **101**(13):4992-5002.
14. Yang B, Wyman CE: **Pretreatment: the key to unlocking low- cost cellulosic ethanol.** *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 2008, **2**(1):26-40.
15. van Wyk JPH: **Biotechnology and the utilization of biowaste as a resource for bioproduct development.** *Trends in Biotechnology* 2001, **19**(5):172-177.
16. Geboers JA, Van de Vyver S, Ooms R, de Beeck BO, Jacobs PA, Sels BF: **Chemocatalytic conversion of cellulose: opportunities, advances and pitfalls.** *Catalysis Science & Technology* 2011, **1**(5):714-726.
17. Chamoulaud GI: **Valorisation de la biomasse: transformations électrocatalytiques du furfural.** Poitiers; 2000.
18. Ragauskas A, Beckham G, J Bidy M, Chandra R, Chen F, F Davis M, H Davison B, Dixon R, Gilna P, Keller M *et al*: **Lignin Valorization: Improving Lignin Processing in the Biorefinery**, vol. 344; 2014.
19. Anwar Z, Gulfraz M, Irshad M: **Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review.** *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 2014, **7**(2):163-173.
20. Ebringerová A: **Structural Diversity and Application Potential of Hemicelluloses.** *Macromolecular Symposia* 2005, **232**(1):1-12.
21. Rabetafika HN, Paquot M, Dubois P: **Les polymères issus du végétal: matériaux à propriétés spécifiques pour des applications ciblées en industrie plastique.** *Biotechnologie, agronomie, société et environnement* 2006, **10**(3):185-196.
22. Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig E-M, Linder T, Wawrosch C, Uhrin P, Temml V, Wang L, Schwaiger S, Heiss EH *et al*: **Discovery and resupply**

**of pharmacologically active plant-derived natural products: A review.** *Biotechnology Advances* 2015, **33**(8):1582-1614.

23. Kabera J: **Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Classification, Function and Pharmacological Properties**, vol. 2; 2014.
24. Kataki R, Konwer D: **Fuelwood characteristics of some indigenous woody species of north-east India.** *Biomass and Bioenergy* 2001, **20**(1):17-23.
25. Koppejan J, Van Loo S: **The handbook of biomass combustion and co-firing:** Routledge; 2012.
26. Miranda I, Gominho J, Mirra I, Pereira H: **Fractioning and chemical characterization of barks of *Betula pendula* and *Eucalyptus globulus*.** *Industrial Crops and Products* 2013, **41**:299-305.
27. Bridgeman TG, Darvell LI, Jones JM, Williams PT, Fahmi R, Bridgwater AV, Barraclough T, Shield I, Yates N, Thain SC *et al*: **Influence of particle size on the analytical and chemical properties of two energy crops.** *Fuel* 2007, **86**(1):60-72.
28. Liu X, Bi XT: **Removal of inorganic constituents from pine barks and switchgrass.** *Fuel Processing Technology* 2011, **92**(7):1273-1279.
29. Lattanzio V: **Phenolic Compounds: Introduction;** 2013.
30. Wink M: **Introduction: biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites.** *Annual Plant Reviews Volume 40: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism, Second Edition* 2010:1-19.
31. Delgoda R, Murray J: **Evolutionary perspectives on the role of plant secondary metabolites.** In: *Pharmacognosy*. Elsevier; 2017: 93-100.
32. Boik J, Kirakosyan A, Kaufman PB, Seymour EM, Spelman K: **Interactions of Bioactive Plant Metabolites: Synergism, Antagonism, and Additivity.** In: *Recent Advances in Plant Biotechnology*. Boston, MA: Springer US; 2009: 213-230.
33. Bohlmann J, Keeling CI: **Terpenoid biomaterials.** *The Plant Journal* 2008, **54**(4):656-669.
34. Wu S, Chappell J: **Metabolic engineering of natural products in plants; tools of the trade and challenges for the future.** *Current Opinion in Biotechnology* 2008, **19**(2):145-152.

35. Osbourn AE, Qi X, Townsend B, Qin B: **Dissecting plant secondary metabolism – constitutive chemical defences in cereals.** *New Phytologist* 2003, **159**(1):101-108.
36. Miller HI: **The Story of Taxol: Nature and Politics in the Pursuit of an Anti-Cancer Drug.** *Nature Medicine* 2001, **7**:148.
37. Nadeem M, Rikhari HC, Kumar A, Palni LMS, Nandi SK: **Taxol content in the bark of Himalayan Yew in relation to tree age and sex.** *Phytochemistry* 2002, **60**(6):627-631.
38. Wink M: **Evolutionary Advantage and Molecular Modes of Action of Multi-Component Mixtures Used in Phytomedicine.** *Current Drug Metabolism* 2008, **9**(10):996-1009.
39. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységu L: **Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis.** *Angewandte Chemie International Edition* 2011, **50**(3):586-621.
40. Harborne J: **Plant phenolics.** In 'Encyclopedia of Plant Physiology, Vol. 8, Secondary Plant Products', (BV Charleswood and EA Bell, eds). In: Springer, Berlin; 1980.
41. Vogt T: **Phenylpropanoid Biosynthesis.** *Molecular Plant* 2010, **3**(1):2-20.
42. Winkel-Shirley B: **Biosynthesis of flavonoids and effects of stress.** *Current opinion in plant biology* 2002, **5**(3):218-223.
43. Wink M: **Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites.** *Medicines* 2015, **2**(3):251-286.
44. Bhattacharya A, Sood P, Citovsky V: **The roles of plant phenolics in defence and communication during Agrobacterium and Rhizobium infection.** *Molecular plant pathology* 2010, **11**(5):705-719.
45. La Camera S, Gouzerh G, Dhondt S, Hoffmann L, Fritig B, Legrand M, Heitz T: **Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways.** *Immunological reviews* 2004, **198**(1):267-284.
46. Smith JL, De Moraes CM, Mescher MC: **Jasmonate- and salicylate- mediated plant defense responses to insect herbivores, pathogens and parasitic plants.** *Pest management science* 2009, **65**(5):497-503.



47. Van Wyk B, Wink M: **Phytopharmaceuticals, Herbal drugs and Poisons**. In: Kew Publishing, Cambridge University Press: Cambridge, UK; 2015.
48. Tholl D: **Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants**. In: *Biotechnology of Isoprenoids*. Edited by Schrader J, Bohlmann J. Cham: Springer International Publishing; 2015: 63-106.
49. Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG: **Natural products (secondary metabolites)**. *Biochemistry and molecular biology of plants* 2000, **24**:1250-1319.
50. Schnee C, Köllner TG, Held M, Turlings TC, Gershenzon J, Degenhardt J: **The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, **103**(4):1129-1134.
51. Paddon CJ, Westfall PJ, Pitera DJ, Benjamin K, Fisher K, McPhee D, Leavell M, Tai A, Main A, Eng D: **High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin**. *Nature* 2013, **496**(7446):528.
52. Pateraki I, Heskes AM, Hamberger B: **Cytochromes P450 for terpene functionalisation and metabolic engineering**. In: *Biotechnology of Isoprenoids*. Springer; 2015: 107-139.
53. Kukula-Koch W, Widelski J: **Alkaloids**. In: *Pharmacognosy*. Elsevier; 2017: 163-198.
54. Walstab J, Wohlfarth C, Hovius R, Schmitteckert S, Röth R, Lasitschka F, Wink M, Bönisch H, Niesler B: **Natural compounds boldine and menthol are antagonists of human 5-HT<sub>3</sub> receptors: implications for treating gastrointestinal disorders**. *Neurogastroenterology & Motility* 2014, **26**(6):810-820.
55. Wink M: **Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal application**. In: *Chemical ecology of alkaloids*. Plenum Press: New York; 1998: pp. 265–300.
56. Wink M: **Molecular modes of action of drugs used in phytopharmaceuticals**: Taylor & Francis: London, UK; 2012.
57. Möller M, Wink M: **Characteristics of apoptosis induction by the alkaloid emetine in human tumour cell lines**. *Planta medica* 2007, **73**(13):1389-1396.
58. Wink M: **Secondary metabolites from plants inhibiting ABC transporters and reversing resistance of cancer cells and microbes to cytotoxic and antimicrobial agents**. *Frontiers in microbiology* 2012, **3**:130.



59. Efferth T, Wink M: **Chemical-biology of natural products from medicinal plants for cancer therapy**. In: *Alternative and Complementary Therapies for Cancer*. Springer; 2010: 557-582.
60. Ma Y, Wink M: **The beta- carboline alkaloid harmine inhibits BCRP and can reverse resistance to the anticancer drugs mitoxantrone and camptothecin in breast cancer cells**. *Phytotherapy research* 2010, **24**(1):146-149.
61. Schmeller T, Latz-Brüning B, Wink M: **Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganisms and herbivores**. *Phytochemistry* 1997, **44**(2):257-266.
62. Vaistij FE, Lim E-K, Edwards R, Bowles DJ: **Glycosylation of Secondary Metabolites and Xenobiotics**. In: *Plant-derived Natural Products: Synthesis, Function, and Application*. Edited by Osbourn AE, Lanzotti V. New York, NY: Springer US; 2009: 209-228.
63. Rai A, Umashankar S, Rai M, Kiat LB, Bing JAS, Swarup S: **Coordinate Regulation of Metabolite Glycosylation and Stress Hormone Biosynthesis by TT8 in Arabidopsis**. *Plant Physiology* 2016, **171**(4):2499-2515.
64. Bowles D, Isayenkova J, Lim E-K, Poppenberger B: **Glycosyltransferases: managers of small molecules**. *Current Opinion in Plant Biology* 2005, **8**(3):254-263.
65. Harborne JB, Baxter H: **The handbook of natural flavonoids. Volume 1 and Volume 2**: John Wiley and Sons; 1999.
66. Perala D: **Populus tremuloicis Michx. Quaking Aspen**. *Silvics of north America* 1990, **2**:555-569.
67. Gouvernement du Canada: **Choix des essences d'arbres et d'arbustes : Peuplier faux-tremble**. In. Edited by Agriculture et Agroalimentaire Canada; 2015.
68. Ritch-Krc E, Thomas S, Turner N, Towers G: **Carrier herbal medicine: traditional and contemporary plant use**. *Journal of Ethnopharmacology* 1996, **52**(2):85-94.
69. Arnason T, Hebda RJ, Johns T: **Use of plants for food and medicine by Native Peoples of eastern Canada**. *Canadian Journal of Botany* 1981, **59**(11):2189-2325.

70. Bouchard M: **Identification d'utilisations pour le bouleau à papier et le peuplier faux-tremble**. Québec: Enseignement supérieur, Recherche, science et technologie; 2013.
71. M.P. Fernandez, P.A. Watson, Breuil C: **Gas chromatography–mass spectrometry method for the simultaneous determination of wood extractive compounds in quaking aspen**. *Journal of Chromatography A* 2001, **922**:225-233.
72. Diouf PN, Stevanovic T, Cloutier A: **Antioxidant properties and polyphenol contents of trembling aspen bark extracts**. *Wood science and technology* 2009, **43**(5-6):457-470.
73. Thieme H: **Über die phenolglykoside der grattung populus**. *Planta Medica* 1967, **15**(01):35-40.
74. Vardar-Ünlü G, Silici S, Ünlü M: **Composition and in vitro antimicrobial activity of Populus buds and poplar-type propolis**. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2008, **24**(7):1011-1017.
75. Silici S, Kutluca S: **Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region**. *Journal of Ethnopharmacology* 2005, **99**(1):69-73.
76. McCune LM, Johns T: **Antioxidant activity relates to plant part, life form and growing condition in some diabetes remedies**. *Journal of Ethnopharmacology* 2007, **112**(3):461-469.
77. Bartzatt R, Cirillo SL, Cirillo JD: **Antibacterial activity of dipeptide constructs of acetylsalicylic acid and nicotinic acid**. *Drug delivery* 2007, **14**(2):105-109.
78. Park E-S, Moon W-S, Song M-J, Kim M-N, Chung K-H, Yoon J-S: **Antimicrobial activity of phenol and benzoic acid derivatives**. *International biodeterioration & biodegradation* 2001, **47**(4):209-214.
79. Herald PJ, Davidson PM: **Antibacterial Activity of Selected Hydroxycinnamic Acids**. *Journal of Food Science* 1983, **48**(4):1378-1379.
80. García-Sosa K, Villarreal-Alvarez N, Lübben P, Peña-Rodríguez LM: **Chrysophanol, an antimicrobial anthraquinone from the root extract of Colubrina greggii**. *Journal of the Mexican Chemical Society* 2006, **50**(2):76-78.

81. Albrecht M, Nahrstedt A, Luepke N-P, Theisen N, Baron G: **Anti-inflammatory activity of flavonol glycosides and salicin derivatives from the leaves of *Populus tremuloides***. *Planta Medica* 1990, **56**(06):660-660.
82. Health Canada: **Guidance document - Disinfectant drugs**. In. Edited by Minister of Health. Ottawa, Ontario, K1A 0K9; 2018.
83. VanMeter KC, Hubert RJ: **Microbiology for the Healthcare Professional-E-Book**: Elsevier Health Sciences; 2015.
84. Guardabassi L, Courvalin P: **Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance**. In: *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin*. American Society of Microbiology; 2006: 1-18.
85. McDonnell G, Russell DA: **Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance**. *Clinical Microbiology Review* 1999, **12**(1):147-179.
86. Dhanasekaran D, Thajuddin N, Panneerselvam A: **Antimicrobials: synthetic and natural compounds**: CRC Press; 2015.
87. Farha MA, Brown ED: **Strategies for target identification of antimicrobial natural products**. *Natural product reports* 2016, **33**(5):668-680.
88. Butler MS, Buss AD: **Natural products — The future scaffolds for novel antibiotics?** *Biochemical Pharmacology* 2006, **71**(7):919-929.
89. Montecalvo MA: **Ramoplanin: a novel antimicrobial agent with the potential to prevent vancomycin-resistant enterococcal infection in high-risk patients**. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003, **51**(suppl\_3):iii31-iii35.
90. Kavanagh F, Hervey A, Robbins WJ: **Antibiotic substances from basidiomycetes VIII. *Pleurotus Multilus* (Fr.) Sacc. and *Pleurotus passeckerianus* Pilat**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1951, **37**(9):570-574.
91. Cowan MM: **Plant products as antimicrobial agents**. *Clinical microbiology reviews* 1999, **12**(4):564-582.
92. Savoia D: **Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics**. *Future microbiology* 2012, **7**(8):979-990.
93. Quave CL: **Antibiotics from nature: traditional medicine as a source of new solutions for combating antimicrobial resistance**. 2016.

94. Kulow M, Zibae F, Allard M, Döpfer D: **Determination of the ability of Thymox to kill or inhibit various species of microorganisms associated with infectious causes of bovine lameness in vitro.** *Journal of dairy science* 2015, **98**(11):7899-7905.
95. Brown D: **Antibiotic resistance breakers: can repurposed drugs fill the antibiotic discovery void?** *Nature Reviews Drug Discovery* 2015, **14**(12):821.
96. Ventola CL: **The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats.** *Pharmacy and Therapeutics* 2015, **40**(4):277-283.
97. Shrestha B, Pokhrel BM, Mohapatra TM: **Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus: A Review.** *Recent Advances in Microbiology* 2012:81.
98. Wright Gerard D: **Antibiotics: A New Hope.** *Chemistry & Biology* 2012, **19**(1):3-10.
99. Magee J, Pritchard EL, Fitzgerald KA, Dunstan F, Howard A: **Antibiotic prescribing and antibiotic resistance in community practice: retrospective study, 1996-8.** *Bmj* 1999, **319**(7219):1239-1240.
100. Grzegorz Nalecz-Jawecki EG-S, and Patrycja Narkiewicz: **The toxicity of cationic surfactants in four bioassays.** *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2003, **54**:87-91.
101. Chen Y, Geurts M, Sjollem SB, Kramer NI, Hermens JLM, Droge STJ: **Acute toxicity of the cationic surfactant C12-benzalkonium in different bioassays : How test design affects bioavailability and effect concentrations.** *Environmental Toxicology and Chemistry* 2014, **33**(3):606-615.
102. Durham J, C. Young J: **Toxic Impact of Commercial Biocides on Industrial Wastewater Treatment Systems**, vol. 2009; 2009.
103. Mc Dermott PF, Walker RD, White DG: **Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance.** *International journal of toxicology* 2003, **22**(2):135-143.
104. Sun Y, Shang D: **Inhibitory Effects of Antimicrobial Peptides on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation.** *Mediators of Inflammation* 2015, **2015**:167572.

105. Epand RM, Walker C, Epand RF, Magarvey NA: **Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 2016, **1858**(5):980-987.
106. Cohen ML: **Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era.** *Science(Washington)* 1992, **257**(5073):1050-1055.
107. Gold HS, Moellering Jr RC: **Antimicrobial-drug resistance.** *New England Journal of Medicine* 1996, **335**(19):1445-1453.
108. Gurib-Fakim A: **Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow.** *Molecular Aspects of Medicine* 2006, **27**(1):1-93.
109. Rates SMK: **Plants as source of drugs.** *Toxicon* 2001, **39**(5):603-613.
110. Pal D, Singh H, Kumar M: **A preliminary study on the in vitro antioxidant activity of seeds of Aesculus indica and barks of Populus euphratica.** *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2012, **4**(4):249-250.
111. Cushnie TPT, Cushnie B, Lamb AJ: **Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities.** *International Journal of Antimicrobial Agents* 2014, **44**(5):377-386.
112. Lu J-J, Bao J-L, Chen X-P, Huang M, Wang Y-T: **Alkaloids Isolated from Natural Herbs as the Anticancer Agents.** *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012, **2012**:12.
113. Pandey KB, Rizvi SI: **Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease.** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2009, **2**(5):270-278.
114. Inouye S, Takizawa T, Yamaguchi H: **Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2001, **47**(5):565-573.
115. Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, Saija A, Mazzanti G, Bisignano G: **Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2005, **49**(6):2474-2478.
116. Demirbas A, Demirbas MF: **Biorefineries.** In: *Algae Energy*. Springer; 2010: 159-181.

117. Yubin J, Miao Y, Bing W, Yao Z: **The extraction, separation and purification of alkaloids in the natural medicine.** *J Chem Pharm Res* 2014, **6**(1):338-345.
118. Prado JM, Meireles MAA: **Supercritical fluid extraction of lemon verbena (*Aloysia triphylla*): kinetics, scale-up and chemical composition.** In: *12th European Meeting on Supercritical Fluids, Graz-Austria: 2010.*
119. **SiliaPlate™- TLC Visualization Methods**  
[\[http://www.silicycle.com/ca/products/thin-layer-chromatography-tlc-plates/siliaplate-tlc-visualization-methods\]](http://www.silicycle.com/ca/products/thin-layer-chromatography-tlc-plates/siliaplate-tlc-visualization-methods)
120. Jia Z, Tian C: **Quantitative determination of polyethylene glycol with modified Dragendorff reagent method.** *Desalination* 2009, **247**(1):423-429.
121. Clinical and Laboratory Standards Institute: **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing filamentous fungi, approved standard.** In: *CLSI document M38-A2*. 950 West Valley Road, suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA; 2008.
122. Clinical and Laboratory Standards Institute: **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, approved standard.** In: *CLSI document M07-A9*. 950 West Valley Road, suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA; 2012.
123. Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Orešič M: **MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data.** *BMC Bioinformatics* 2010, **11**(1):395.
124. White RH: **Effect of lignin content and extractives on the higher heating value of wood.** *Wood and fiber science* 2007, **19**(4):446-452.
125. Viral V. Mehta GR, As hwini Rao, Ramya Shenoy, Mithun Pai B.H.: **Antimicrobial Efficacy of Punica granatum mesocarp, Nelumbo nucifera Leaf, Psidium guajava Leaf and Coffea Canephora Extract on Common Oral Pathogens: An In-vitro Study.** *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2014, **8**(7):65-68.
126. Nadeem Khan, Arshad Mehmood Abbasi, Ghulam Dastagir, Abdul Nazir, Ghulam Mujtaba Shah, Shah MMSaMH: **Ethnobotanical and antimicrobial study of some selected medicinal plants used in Khyber Pakhtunkhwa (KPK) as a potential source to cure infectious diseases.** *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2014, **14**(122):1-10.

127. Anja Klančnik SP, Barbara Jeršek, Sonja Smole Možina: **Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts.** *Journal of Microbiological Methods* 2010, **81**:121-126.
128. Proestos C, Boziaris I, Nychas G-J, Komaitis M: **Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity.** *Food Chemistry* 2006, **95**(4):664-671.
129. Puupponen- Pimiä R, Nohynek L, Meier C, Kähkönen M, Heinonen M, Hopia A, Oksman- Caldentey KM: **Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries.** *Journal of applied microbiology* 2001, **90**(4):494-507.
130. Taguri T, Tanaka T, Kouno I: **Antibacterial spectrum of plant polyphenols and extracts depending upon hydroxyphenyl structure.** *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2006, **29**(11):2226-2235.
131. Fattouch S, Caboni P, Coroneo V, Tuberoso CI, Angioni A, Dessi S, Marzouki N, Cabras P: **Antimicrobial activity of Tunisian quince (*Cydonia oblonga* Miller) pulp and peel polyphenolic extracts.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007, **55**(3):963-969.
132. Panizzi L, Caponi C, Catalano S, Cioni PL, Morelli I: **In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*.** *Journal of Ethnopharmacology* 2002, **79**(2):165-168.
133. Nenaah G: **Antimicrobial activity of *Calotropis procera* Ait. (Asclepiadaceae) and isolation of four flavonoid glycosides as the active constituents.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2013, **29**(7):1255-1262.
134. Méndez C, Salas JA: **Altering the glycosylation pattern of bioactive compounds.** *Trends in Biotechnology* 2001, **19**(11):449-456.
135. Fu X, Albermann C, Jiang J, Liao J, Zhang C, Thorson JS: **Antibiotic optimization via in vitro glycorandomization.** *Nature biotechnology* 2003, **21**(12):1467-1469.
136. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ: **Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships.** *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2002, **13**(10):572-584.
137. Gachon CMM, Langlois-Meurinne M, Saindrenan P: **Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis.** *Trends in Plant Science* 2005, **10**(11):542-549.

138. Cushnie TT, Lamb AJ: **Antimicrobial activity of flavonoids.** *International journal of antimicrobial agents* 2005, **26**(5):343-356.
139. Watson SP, Clements MO, Foster SJ: **Characterization of the Starvation-Survival Response of Staphylococcus aureus.** *Journal of Bacteriology* 1998, **180**(7):1750-1758.
140. Rauha J-P, Remes S, Heinonen M, Hopia A, Kähkönen M, Kujala T, Pihlaja K, Vuorela H, Vuorela P: **Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds.** *International journal of food microbiology* 2000, **56**(1):3-12.
141. Sohn HY, Son KH, Kwon CS, Kwon GS, Kang SS: **Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: Morus alba L., Morus mongolica Schneider, Broussnetia papyrifera (L.) Vent, Sophora flavescens Ait and Echinosophora koreensis Nakai.** *Phytomedicine* 2004, **11**(7):666-672.
142. Lindroth R, Osier T, Barnhill H, Wood S: **Effects of genotype and nutrient availability on phytochemistry of trembling aspen (Populus tremuloides Michx.) during leaf senescence.** *Biochemical Systematics and Ecology* 2002, **30**(4):297-307.
143. Osier TL, Hwang S-Y, Lindroth RL: **Within- and between-year variation in early season phytochemistry of quaking aspen (Populus tremuloides Michx.) clones.** *Biochemical Systematics and Ecology* 2000, **28**(3):197-208.
144. Abuelsaad AS, Mohamed I, Allam G, Al-Solumani AA: **Antimicrobial and immunomodulating activities of hesperidin and ellagic acid against diarrheic Aeromonas hydrophila in a murine model.** *Life sciences* 2013, **93**(20):714-722.
145. Yi Z, Yu Y, Liang Y, Zeng B: **In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of Pericarpium Citri Reticulatae of a new Citrus cultivar and its main flavonoids.** *LWT-Food Science and Technology* 2008, **41**(4):597-603.
146. Kocaçalışkan I, Talan I, Terzi I: **Antimicrobial activity of catechol and pyrogallol as allelochemicals.** *Zeitschrift für Naturforschung C* 2006, **61**(9-10):639-642.
147. Jeong E-Y, Jeon J-H, Lee C-H, Lee H-S: **Antimicrobial activity of catechol isolated from Diospyros kaki Thunb. roots and its derivatives toward intestinal bacteria.** *Food chemistry* 2009, **115**(3):1006-1010.



148. Hwang JH, Choi H, Hwang I-s, Kim AR, Woo E-R, Lee DG: **Synergistic Antibacterial and Antibiofilm Effect Between (+)-Medioresinol and Antibiotics In Vitro.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2013, **170**(8):1934-1941.
149. Hwang JH, Hwang I-s, Liu Q-H, Woo E-R, Lee DG: **(+)-Medioresinol leads to intracellular ROS accumulation and mitochondria-mediated apoptotic cell death in *Candida albicans*.** *Biochimie* 2012, **94**(8):1784-1793.
150. Cha J-D, Jeong M-R, Jeong S-I, Lee K-Y: **Antibacterial activity of sophoraflavanone G isolated from the roots of *Sophora flavescens*.** *Journal of microbiology and biotechnology* 2007, **17**(5):858-864.
151. Tsuchiya H, Iinuma M: **Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*.** *Phytomedicine* 2000, **7**(2):161-165.
152. Chi YS, Jong HG, Son KH, Chang HW, Kang SS, Kim HP: **Effects of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: cyclooxygenases and lipoxygenases.** *Biochemical pharmacology* 2001, **62**(9):1185-1191.
153. Kuete V, Nguemaving JR, Beng VP, Azebaze AGB, Etoa F-X, Meyer M, Bodo B, Nkengfack AE: **Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Vismia laurentii* De Wild (Guttiferae).** *Journal of Ethnopharmacology* 2007, **109**(3):372-379.
154. He M, Wu T, Pan S, Xu X: **Antimicrobial mechanism of flavonoids against *Escherichia coli* ATCC 25922 by model membrane study.** *Applied Surface Science* 2014, **305**:515-521.
155. da Costa MP, Bozinis MCV, Andrade WM, Costa CR, da Silva AL, Alves de Oliveira CM, Kato L, Fernandes OdFL, Souza LKH, Silva MdRR: **Antifungal and cytotoxicity activities of the fresh xylem sap of *Hymenaea courbaril* L. and its major constituent fisetin.** *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2014, **14**(1):245.
156. Saxena G, McCutcheon AR, Farmer S, Towers GHN, Hancock REW: **Antimicrobial constituents of *Rhus glabra*.** *Journal of Ethnopharmacology* 1994, **42**(2):95-99.
157. Kukić J, Popović V, Petrović S, Mucaji P, Ćirić A, Stojković D, Soković M: **Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts.** *Food Chemistry* 2008, **107**(2):861-868.

158. Basile A, Sorbo S, Giordano S, Ricciardi L, Ferrara S, Montesano D, Cobianchi RC, Vuotto M, Ferrara L: **Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves.** *Fitoterapia* 2000, **71**:S110-S116.
159. Basile A, Giordano S, López-Sáez JA, Cobianchi RC: **Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses.** *Phytochemistry* 1999, **52**(8):1479-1482.
160. Liu G, Liang J-C, Wang X-L, Li Z-H, Wang W, Guo N, Wu X-P, Shen F-G, Xing M-X, Liu L-H: **In vitro synergy of biochanin A and ciprofloxacin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*.** *molecules* 2011, **16**(8):6656-6666.
161. Lou Z, Wang H, Rao S, Sun J, Ma C, Li J: **p-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms.** *Food Control* 2012, **25**(2):550-554.
162. Stojković D, Petrović J, Soković M, Glamočlija J, Kukić-Marković J, Petrović S: **In situ antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, p-coumaric acid and rutin, using food systems.** *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2013, **93**(13):3205-3208.
163. Merkl R, HRádková I, Fllp V, ŠMIdRkal J: **Antimicrobial and antioxidant properties of phenolic acids alkyl esters.** *Czech J Food Sci* 2010, **28**(4):275-279.
164. Lee O-H, Lee B-Y: **Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract.** *Bioresource technology* 2010, **101**(10):3751-3754.
165. Saavedra MJ, Borges A, Dias C, Aires A, Bennett RN, Rosa ES, Simões M: **Antimicrobial activity of phenolics and glucosinolate hydrolysis products and their synergy with streptomycin against pathogenic bacteria.** *Medicinal Chemistry* 2010, **6**(3):174-183.
166. Vaquero MR, Alberto M, de Nadra MM: **Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines.** *Food Control* 2007, **18**(2):93-101.
167. Cueva C, Moreno-Arribas MV, Martín-Álvarez PJ, Bills G, Vicente MF, Basilio A, Rivas CL, Requena T, Rodríguez JM, Bartolomé B: **Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria.** *Research in Microbiology* 2010, **161**(5):372-382.
168. Si W, Gong J, Tsao R, Zhou T, Yu H, Poppe C, Johnson R, Du Z: **Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria.** *Journal of Applied Microbiology* 2006, **100**(2):296-305.

169. Heleno SA, Ferreira IC, Esteves AP, Ćirić A, Glamočlija J, Martins A, Soković M, Queiroz MJR: **Antimicrobial and demelanizing activity of Ganoderma lucidum extract, p-hydroxybenzoic and cinnamic acids and their synthetic acetylated glucuronide methyl esters.** *Food and chemical toxicology* 2013, **58**:95-100.
170. Huq A, Jamal JA, Stanslas J: **Ethnobotanical, phytochemical, pharmacological, and toxicological aspects of Persicaria hydropiper (L.) delarbre.** *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014, **2014**.
171. Duraipandiyan V, Indwar F, Ignacimuthu S: **Antimicrobial activity of confertifolin from Polygonum hydropiper.** *Pharmaceutical biology* 2010, **48**(2):187-190.
172. Barreca D, Bellocco E, Laganà G, Ginestra G, Bisignano C: **Biochemical and antimicrobial activity of phloretin and its glycosilated derivatives present in apple and kumquat.** *Food Chemistry* 2014, **160**:292-297.
173. Baldisserotto A, Malisardi G, Scalambra E, Andreotti E, Romagnoli C, Vicentini CB, Manfredini S, Vertuani S: **Synthesis, antioxidant and antimicrobial activity of a new phloridzin derivative for dermo-cosmetic applications.** *Molecules* 2012, **17**(11):13275-13289.
174. Bisignano G, Sanogo R, Marino A, Aquino R, 'angelo VD, German, ograve MP, De Pasquale R, Pizza C: **Antimicrobial activity of Mitracarpus scaber extract and isolated constituents.** *Letters in Applied Microbiology* 2000, **30**(2):105-108.
175. Čerňáková M, Košťálová D: **Antimicrobial activity of berberine—a constituent of Mahonia aquifolium.** *Folia Microbiologica* 2002, **47**(4):375-378.
176. Stermitz FR, Lorenz P, Tawara JN, Zenewicz LA, Lewis K: **Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000, **97**(4):1433-1437.
177. Ojala T, Remes S, Haansuu P, Vuorela H, Hiltunen R, Haahtela K, Vuorela P: **Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland.** *Journal of ethnopharmacology* 2000, **73**(1):299-305.
178. Yao X, Zhu X, Pan S, Fang Y, Jiang F, Phillips GO, Xu X: **Antimicrobial activity of nobiletin and tangeretin against Pseudomonas.** *Food chemistry* 2012, **132**(4):1883-1890.
179. Raybaudi-Massilia RM, Mosqueda-Melgar J, Martín-Belloso O: **Antimicrobial activity of malic acid against Listeria monocytogenes, Salmonella Enteritidis**

- and Escherichia coli O157: H7 in apple, pear and melon juices.** *Food Control* 2009, **20**(2):105-112.
180. Gadang V, Hettiarachchy N, Johnson M, Owens C: **Evaluation of antibacterial activity of whey protein isolate coating incorporated with nisin, grape seed extract, malic acid, and EDTA on a turkey frankfurter system.** *Journal of Food Science* 2008, **73**(8).
  181. Eswaranandam S, Hettiarachchy N, Johnson M: **Antimicrobial activity of citric, lactic, malic, or tartaric acids and nisin- incorporated soy protein film against Listeria monocytogenes, Escherichia coli O157: H7, and Salmonella gaminara.** *Journal of Food Science* 2004, **69**(3).
  182. Wang J, Zhao H, Kong W, Jin C, Zhao Y, Qu Y, Xiao X: **Microcalorimetric assay on the antimicrobial property of five hydroxyanthraquinone derivatives in rhubarb (Rheum palmatum L.) to Bifidobacterium adolescentis.** *Phytomedicine* 2010, **17**(8):684-689.
  183. Yanwen W, Wenyan G, Xiaohu X, Yi L: **Calorimetric investigation of the effect of hydroxyanthraquinones in Rheum officinale Baill on Staphylococcus aureus growth.** *Thermochimica Acta* 2005, **429**(2):167-170.
  184. Friedman M, Henika PR, Mandrell RE: **Antibacterial activities of phenolic benzaldehydes and benzoic acids against Campylobacter jejuni, Escherichia coli, Listeria monocytogenes, and Salmonella enterica.** *Journal of food protection* 2003, **66**(10):1811-1821.
  185. Chang S-T, Chen P-F, Chang S-C: **Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from Cinnamomum osmophloeum.** *Journal of Ethnopharmacology* 2001, **77**(1):123-127.
  186. Smyth T, Ramachandran VN, Smyth WF: **A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins.** *International Journal of Antimicrobial Agents* 2009, **33**(5):421-426.
  187. Centre québécois de valorisation des biotechnologies.: **Études extractibles forestiers : utilisations potentielles, marché et piste d'action pour le Québec** 2014.
  188. Nadeem Khan AMA, Ghulam Dastagir, Abdul Nazir, Ghulam Mujtaba Shah, Shah MMSaMH: **Ethnobotanical and antimicrobial study of some selected medicinal plants used in Khyber Pakhtunkhwa (KPK) as a potential source to cure infectious diseases.** *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2014, **14**(122):1-10.

189. Cavalla D: **Chapter 35 - Web Alert: Using the Internet for Medicinal Chemistry A2 - Wermuth, Camille Georges**. In: *The Practice of Medicinal Chemistry (Fourth Edition)*. Edited by Aldous D, Raboisson P, Rognan D. San Diego: Academic Press; 2015: 825-842.
190. Moco S, Vervoort J, Moco S, Bino RJ, De Vos RCH, Bino R: **Metabolomics technologies and metabolite identification**. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2007, **26**(9):855-866.
191. Zhang A, Sun H, Wang P, Han Y, Wang X: **Modern analytical techniques in metabolomics analysis**. *Analyst* 2012, **137**(2):293-300.
192. Xiao JF, Zhou B, Ressom HW: **Metabolite identification and quantitation in LC-MS/MS-based metabolomics**. *Trends in analytical chemistry : TRAC* 2012, **32**:1-14.
193. Böcker S, Letzel MC, Lipták Z, Pervukhin A: **SIRIUS: decomposing isotope patterns for metabolite identification**. *Bioinformatics* 2009, **25**(2):218-224.
194. Marriott P, Shellie R: **Principles and applications of comprehensive two-dimensional gas chromatography**. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2002, **21**(9):573-583.
195. Fang M, Ivanisevic J, Benton HP, Johnson CH, Patti GJ, Hoang LT, Uritboonthai W, Kurczyk ME, Siuzdak G: **Thermal Degradation of Small Molecules: A Global Metabolomic Investigation**. *Analytical Chemistry* 2015, **87**(21):10935-10941.
196. Gafner S, Bergeron C: **The Challenges of Chemical Stability Testing of Herbal Extracts in Finished Products Using State-of-the-Art Analytical Methodologies**, vol. 1; 2005.
197. Boira H, Blanquer A: **Environmental factors affecting chemical variability of essential oils in *Thymus piperella* L.** *Biochemical Systematics and Ecology* 1998, **26**(8):811-822.
198. Koehn FE, Carter GT: **The evolving role of natural products in drug discovery**. *Nature reviews Drug discovery* 2005, **4**(3):206.
199. Tu Y, Jeffries C, Ruan H, Nelson C, Smithson D, Shelat AA, Brown KM, Li X-C, Hester JP, Smillie T *et al*: **Automated High-Throughput System to Fractionate Plant Natural Products for Drug Discovery**. *Journal of Natural Products* 2010, **73**(4):751-754.

200. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK: **Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review.** *Journal of Pharmaceutical Analysis* 2016, **6**(2):71-79.
201. Meletiadiis J, Leth Mortensen K, Verweij PE, Mouton JW, Arendrup MC: **Spectrophotometric reading of EUCAST antifungal susceptibility testing of *Aspergillus fumigatus*.** *Clinical Microbiology and Infection* 2017, **23**(2):98-103.
202. Arikan S: **Current status of antifungal susceptibility testing methods.** *Medical Mycology* 2007, **45**(7):569-587.
203. Othman M, Loh HS, Wiart C, Khoo TJ, Lim KH, Ting KN: **Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts.** *Journal of Microbiological Methods* 2011, **84**(2):161-166.
204. Irena M. Choma EMG: **Bioautography detection in thin-layer chromatography.** *Journal of Chromatography A* 2011, **1218**:2684-2691.
205. Saikat Dewanjee MG, Nilo yBhattacharya, Ritu Khanra, Tarun K. Duaa: **Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry.** *Journal of Pharmaceutical Analysis* 2015, **5**(2):75-84.
206. Shai LJ, McGaw LJ, Aderogba MA, Mdee LK, Eloff JN: **Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentata* (Burm.f) C.A. Sm. leaves.** *Journal of Ethnopharmacology* 2008, **119**(2):238-244.